



**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**TESIS:**

**“VALIDACIÓN DE MÉTODO PARA CUANTIFICACIÓN DE NIFEDIPINO  
POR ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA-VIS”**

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**Bachiller: HUAMÁN ZACARÍAS, ILIANOVA MASIEL**

**ASESOR: QF. GRANDE ORTIZ MIGUEL.**

**LIMA – PERÚ**

**2016**

## **DEDICATORIA**

A mi madre por su apoyo incondicional en lograr mis metas y hermano por sus constantes ánimos de superación.  
A mi hijo por ser mi motor y motivo.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco al Dr. Miguel Grande por su apoyo, dedicación, tiempo y compartir su experiencia académica durante el desarrollo de la tesis.

## RESUMEN

La validación del método analítico es parte integral del sistema de control de calidad, puesto que confiere fiabilidad a los resultados analíticos obtenidos en un laboratorio de análisis, a fin de asegurar que un medicamento cumpla los parámetros de calidad establecidos. En este trabajo presentamos la validación de un método analítico de cuantificación de Nifedipino de 10 mg en tabletas, con el empleo de etanol al 96 % como solvente, utilizando la técnica de espectrofotometría ultravioleta visible según las especificaciones técnicas señaladas para este producto farmacéutico en la USP 39. Se determinaron los parámetros de linealidad; obteniéndose un coeficiente de determinación  $r = 0,9983$ , siendo el valor mínimo permisible de 0,997, exactitud obteniéndose en la investigación un porcentaje de recuperación de 98,3%, precisión siendo los valores de Coeficiente de variación (CV) obtenidos 0,83% para repetibilidad y 0,12% para precisión intermedia donde el valor máximo permitido es un CV = 3% y robustez obteniendo un CV= 0,8, donde el valor máximo permitido es  $CV \leq 2$ . Se comprobó que el método es lineal, exacto, preciso y robusto en un rango de 85 a 115 %, lo que demuestra la fiabilidad del método y su posibilidad de empleo en el control de la calidad de la forma terminada.

### PALABRAS CLAVE

Linealidad, precisión, exactitud, robustez, nifedipino, espectrofotometría UV-VIS, validación.

## ABSTRACT

The validation of the analytical method is an integral part of the quality control system, since it confers reliability to the analytical results obtained in a laboratory, to ensure that a drug meets the established quality parameters. In this paper we present the validation of an analytical method of quantifying Nifedipine 10 mg tablets, with the use of 96% ethanol as a solvent, using spectrophotometry ultraviolet visible according to the technical specifications indicated for this pharmaceutical product in the USP 39. linearity parameters were determined; obtaining a determination coefficient  $r = 0.9983$  being the minimum permissible value of 0.997, accuracy obtained in the investigation a recovery percentage of 98.3%, accuracy values being Coefficient of variation (CV) obtained 0.83% for repeatability and 0.12% for intermediate precision where the maximum value is a CV = 3% and robustness obtaining a CV =, where the maximum allowed value is  $CV \leq 2$ . it was found that the method is linear, accurate, precise and robust in a range of 85 to 115%, demonstrating the reliability of the method and its possible use in controlling the quality of the finished form.

KEYWORDS Linearity, precision, accuracy, robustness, nifedipine, UV-VIS spectrophotometry validation.

## ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| CARÁTULA.....   | I         |
| DEDICATORIA .....   | II        |
| AGRADECIMIENTO .....                                      | III       |
| RESUMEN .....   | IV        |
| ABSTRACT .....  | V         |
| ÍNDICE .....  | VI        |
| ÍNDICE DE TABLAS .....                                    | IX        |
| ÍNDICE DE GRÁFICOS .....                                  | X         |
| INTRODUCCIÓN .....  | XI        |
| <br>  |           |
| <b>CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>        | <b>13</b> |
| 1.1 Descripción de la Realidad Problemática .....         | 13        |
| 1.2 Formulación del Problema .....                        | 14        |
| 1.3 Objetivos de la Investigación .....                   | 14        |
| 1.3.1 Objetivo General.....                               | 14        |
| 1.3.2 Objetivos Específicos.....                          | 14        |
| 1.4 Hipótesis de la Investigación.....                    | 14        |
| 1.4.1 Hipótesis General .....                             | 14        |
| 1.4.2 Hipótesis Secundarias .....                         | 14        |
| 1.5 Justificación e Importancia de la Investigación ..... | 15        |
| 1.5.1 Justificación de la Investigación.....              | 15        |
| 1.5.2 Importancia de la Investigación .....               | 16        |
| <br>  |           |
| <b>CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....</b>                    | <b>17</b> |
| 2.1 Antecedentes de la Investigación .....                | 17        |
| 2.1.1 A nivel Nacional .....                              | 17        |
| 2.1.2 A nivel Internacional.....                          | 18        |
| 2.2 Bases Teóricas .....                                  | 19        |
| 2.2.1 Validación de Métodos.....                          | 19        |
| 2.2.1.1 Concepto.....                                     | 19        |
| 2.2.1.2 Tipos de Validación.....                          | 21        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.2.1.2 Etapas de Validación .....   | 23        |
| 2.2.1.3 Parámetros de Validación .....   | 25        |
| 2.2.2 Espectrofotometría Ultravioleta Visible .....                                    | 29        |
| 2.2.2.1 Concepto.....  | 29        |
| 2.2.2.2 Transmitancia y Absorbancia .....  | 32        |
| 2.2.2.3 Ley de Lambert-Beer .....  | 32        |
| 2.2.2.4 Obtención de un Espectro de Absorción .....                                    | 34        |
| 2.2.2.5 Curva de Calibrado .....   | 35        |
| 2.2.2.6 Tipos de Espectrofotometría .....  | 36        |
| 2.2.2.7 Características del Equipo de Espectrofotometría<br>Ultravioleta Visible ..... | 37        |
| 2.2.3 Nifedipino .....   | 40        |
| 2.2.3.1 Descripción .....  | 40        |
| 2.2.3.2 Estructura Química .....   | 40        |
| 2.2.3.3 Propiedades Físicas y Químicas.....  | 41        |
| 2.2.3.4 Propiedades Farmacológicas.....  | 42        |
| 2.2.3.5 Contraindicaciones.....  | 43        |
| 2.2.3.6 Efectos adversos.....  | 44        |
| 2.3 Definición de términos básicos .....   | 44        |
| <b>CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....</b>                              | <b>46</b> |
| 3.1 Tipo de Investigación .....  | 46        |
| 3.1.1 Método.....  | 46        |
| 3.1.2 Técnicas .....   | 46        |
| 3.1.3 Diseño.....  | 46        |
| 3.2 Población y Muestreo de la Investigación .....                                     | 46        |
| 3.2.1 Población .....  | 46        |
| 3.2.2 Muestra .....  | 47        |
| 3.3 Variables e Indicadores .....  | 47        |
| 3.4 Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos .....                              | 48        |
| 3.4.1 Técnicas.....  | 48        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.4.2 Instrumentos .....   | 54        |
| <b>CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS</b> .....  | <b>55</b> |
| 4.1 Resultados .....   | 55        |
| 4.2 Análisis e Interpretación de Resultados .....  | 62        |
| Discusión .....  | 65        |
| Conclusiones .....   | 67        |
| Recomendaciones .....  | 68        |
| Fuentes de Información .....   | 69        |
| Anexos .....   | 72        |
| ANEXO N° 1 Matriz de Consistencia .....  | 73        |
| ANEXO N° 2 Preparación de la disolución de Nifedipino patrón de referencia .....   | 74        |
| ANEXO N° 3 Preparación de la disolución muestra de Nifedipino .....  | 75        |
| ANEXO N° 4 Diagrama de flujo del proceso analítico de Nifedipino .....   | 76        |
| ANEXO N° 5 Esquema de dilución para Linealidad .....   | 77        |
| ANEXO N° 6 Esquema de dilución para Repetibilidad .....  | 78        |
| ANEXO N° 7 Esquema de dilución para Robustez .....   | 79        |
| ANEXO N° 8 Informe Técnico de los diferentes parámetros estadísticos que se han estudiado en la validación de Nifedipino de 10mg ..... | 80        |
| ANEXO N° 9 USP 39 .....  | 81        |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| TABLA N° 1 Transmisión de colores según longitudes de onda en la región Ultravioleta visible ..... | 31 |
| TABLA N° 2 Tipos de Espectrofotometría.....  | 36 |
| TABLA N° 3 Propiedades Físicas y Químicas del Nifedipino.....                                      | 41 |
| TABLA N° 4 Peso promedio de contenido de Nifedipino .....  | 55 |
| TABLA N° 5 Lectura de la muestra de Nifedipino .....   | 56 |
| TABLA N° 6 Cuantificación de Nifedipino en tabletas .....  | 57 |
| TABLA N° 7 Prueba de Linealidad.....   | 57 |
| TABLA N° 8 Prueba de Exactitud .....   | 59 |
| TABLA N° 9 Prueba de Repetibilidad .....   | 60 |
| TABLA N° 10 Prueba de Precisión Intermedia.....  | 61 |
| TABLA N° 11 Prueba Robustez .....  | 62 |

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

|  |    |
|--|----|
| GRÁFICO N° 1 Espectro Electromagnético .....   | 30 |
| GRÁFICO N° 2 Espectros de absorción de HNTS y el efecto que ejercen<br>el pH y los oxidantes ..... | 34 |
| GRÁFICO N° 3 Curva de Calibración .....  | 35 |
| GRÁFICO N° 3 Partes de un Espectrofotómetro Ultravioleta visible .....                             | 40 |
| GRÁFICO N° 5 Fórmula estructural del Nifedipino .....  | 40 |
| GRÁFICO N° 6 Curva de Calibración de Nifedipino .....  | 59 |

## INTRODUCCIÓN

La espectrofotometría UV/VIS es una técnica analítica que se utiliza para identificar algunos grupos funcionales de moléculas, y para determinar el contenido de compuestos en distintos tipos de sustancias. Está basada en el proceso de absorción de la radiación ultravioleta-visible, radiación con longitud de onda comprendida entre los 160 y 780 nm. La absorción de esta radiación causa el paso de un electrón a un estado excitado. Los electrones que se excitan al absorber radiación de esta frecuencia son los electrones de enlace de las moléculas, por lo que los picos de absorción se pueden correlacionar con los distintos tipos de enlace presentes en el compuesto. “Las bandas que aparecen en un espectro UV-Vis son anchas debido a la superposición de transiciones vibracionales y electrónicas” (1). Se usa principalmente en análisis medioambiental, farmacéutico y de alimentos, así como en la industria de polímeros y plásticos, en la Industria farmacéutica principalmente para la determinación de pureza de productos manufacturados, nitritos, nitratos en agua y carnes, oligoelementos en plantas, conformación de proteínas globulares, glucosa en vinos, determinación de principios activos, entre otros.

El nifedipino pertenece al grupo de las dihidropiridinas o antagonista de calcio. Actúa sobre la circulación periférica relajando la musculatura lisa vascular y produciendo vasodilatación arterial a dos niveles: Vasodilatación periférica, con una reducción de la resistencia periférica o postcarga, lo que es útil en el tratamiento de la hipertensión arterial y el síndrome de Raynaud y Vasodilatación coronaria, con un aumento del flujo sanguíneo coronario y la oxigenación del miocardio, que sirve para el tratamiento de la angina de pecho.

La validación de un método analítico es la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido todos los requisitos del método, para utilizarlo o aplicarlo en una determinada

prueba; examina las características de desempeño de un método para identificar y establecer cualquier limitación que pueda darse, así como los diferentes factores que pueden influir en el cambio de dichos parámetros y limitaciones; permite demostrar que el método es adecuado para el propósito solicitado. “La validación trata de disminuir o controlar los factores que llevan a la imprecisión o inexactitud de un dato obtenido, a través de la realización de un trabajo analítico dentro de unos parámetros definidos generando una mayor fiabilidad y aceptación de los datos, al estar en proporción con la calidad del proceso de obtención de los mismos” (2). Entre los parámetros analíticos más utilizados se encuentran: linealidad, exactitud, precisión intermedia, repetibilidad, especificidad y robustez, entre otros. El presente trabajo tiene como objetivo realizar la validación de una técnica espectrofotométrica para la determinación de nifedipino en la forma farmacéutica de tableta y proponer este método para su control químico de calidad.

## CAPÍTULO I

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### 1.1. Descripción de la Realidad Problemática

El análisis de los medicamentos se considera de suma importancia, para lo cual se requieren técnicas analíticas confiables. Es por ello que en los laboratorios farmacéuticos como en todo establecimiento de salud donde se utilizan medicamentos (hospitales, puestos de salud y centros de salud), es primordial contar con técnicas analíticas para la determinación de principios activos a fin de verificar la calidad de ellos y que sean confiables para su uso; además de contar con métodos de análisis rápidos para la identificación y cuantificación de dichos compuestos. La confiabilidad de una metodología se puede lograr mediante los adecuados procesos de validación analítica. La Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006 indica que los métodos analíticos utilizados para cuantificar principios activos en materia prima y en productos farmacéuticos deben estar validados adecuadamente de forma obligatoria (3). De esta manera se garantiza la reproducibilidad de los métodos analíticos; por otro lado, la evolución de los equipos analíticos cada vez más sofisticados, sensibles y modernos hacen necesario el empleo de técnicas analíticas que presenten mayores ventajas, incluyendo el volumen de manejo de muestras, sin perder eficiencia con respecto a las condiciones originales. Pero son de elevado costo y muchas veces son difíciles de adquirir ya que no se cuenta con los equipos necesarios para su realización, es por ello que la espectrofotometría ultravioleta-visible es una técnica de elección para el análisis de identificación y el contenido de principios de medicamentos por ser mucho más sencilla, rápida, confiable y sobre todo menos costosa.

## **1.2 Formulación del Problema:**

¿Se podrá validar el método por Espectrofotometría UV-VIS para cuantificación de tabletas de nifedipino de 10mg en el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, junio a agosto 2016?

## **1.3 Objetivos de la Investigación:**

### **1.3.1 Objetivo General**

Efectuar la validación del método por Espectrofotometría UV-VIS para la cuantificación de tabletas de nifedipino de 10mg en el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen junio a agosto 2016.

### **1.3.2 Objetivos Específicos**

- OE1.** Desarrollar un protocolo de validación del método propuesto.
- OE2.** Determinar los parámetros de validación para el protocolo del método propuesto.
- OE3.** Corroborar la validez del método en la cuantificación de tabletas de nifedipino de 10mg dispensadas en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen.

## **1.4 Hipótesis de la Investigación:**

### **1.4.1 Hipótesis General**

El método por Espectrofotometría UV-VIS para la determinación de Nifedipino de 10mg podrá ser validado mediante la aplicación del protocolo de validación propuesto.

### **1.4.2 Hipótesis Secundarias**

**HE1.** Es posible diseñar un protocolo de validación para el método propuesto.

**HE2.** Los parámetros de validación especificados en el protocolo para las pruebas de linealidad, exactitud, precisión y robustez se encontrarían dentro de los límites establecidos.

**HE3.** Es posible corroborar la validez del método en la cuantificación de tabletas de nifedipino de 10mg dispensadas en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen.

## **1.5 Justificación e Importancia de la Investigación**

### **1.5.1 Justificación de la Investigación**

Existen muchos métodos para la cuantificación del principio activo nifedipino, como la Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC), Espectrofotometría Infrarroja (I.R.), Espectrofotometría de Masas (MS), entre otros. Estas técnicas a pesar de ser muy confiables, son costosas y muchas veces no se cuenta con el equipo para realizar los análisis necesarios para determinación y cuantificación de principios activos y así demostrar la calidad del producto, en muchos centros de salud. Es por eso que se requiere implementar un método alternativo para cuantificar nifedipino en tabletas de forma más rápida y precisa, capaz de ser utilizado en pruebas *in situ* en el hospital. Por lo que en el presente trabajo se propone efectuar la validación de un método por Espectrofotometría UV-VIS para la determinación de nifedipino procedentes del Hospital Guillermo Almenara Irigoyen.

### **1.5.2 Importancia de la Investigación**

El presente trabajo nos permitirá brindar un método alternativo de bajo costo, eficiente, confiable y rápido, por ser una técnica sencilla que puede ser realizado por el personal capacitado en el área de control de calidad y de esta forma cuantificar las tabletas de nifedipino a nivel hospitalario y así brindar un medicamento de buena calidad que ayudara a la mejora de la salud ya que se administrara una dosis correcta y sobre todo que no produzca efectos adversos indeseables en el paciente que puedan llevar a empeorar el cuadro clínico que están atravesando.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Antecedentes

##### 2.2.1 A nivel Nacional

1.- Morales De La Cruz C. **“Desarrollo y Validación Prospectiva de una Técnica Analítica Por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) para Enalapril 10mg Tabletas Cubiertas”**, Perú-2004: En este trabajo se demostró la aplicabilidad del método analítico propuesto por la USP 26, mediante el cual se validó y se estableció una evidencia documentada de que el método analítico fue capaz de cumplir en forma consistente y repetitiva las especificaciones establecidas. El método fue validado siguiendo una metodología de trabajo prevista en un protocolo de validación donde se analizaron parámetros como son: selectividad, linealidad, exactitud, rango y selección de sistema, concluyéndose que el método analítico propuesto fue “selectivo porque se evidenciaron que los productos de degradación no interfirieron en el análisis del principio activo, fue lineal porque se obtuvo un coeficiente de correlación  $r=0,99987$ , preciso ya que para la repetibilidad se obtuvo una RSD de 0.64% y reproducible con una RSD de 0,88% y además exacto porque se obtuvo un porcentaje de recuperación de 99,88%” (4).

2.- Silva Campos, N. **“Validación de un método analítico por espectrofotometría visible para la cuantificación de Memantina clorhidrato 5 mg en tabletas recubiertas”**, Perú-2014: Mediante esta investigación se realizó la validación de una técnica analítica para su cuantificación de Memantina por espectrofotometría UV. La técnica de análisis se realizó por una reacción de color con púrpura de bromocresol (BCP). El complejo coloreado se

extrajo en cloroformo utilizando un agitador magnético múltiple, y se midió su respuesta a 412nm, demostrando estabilidad de las lecturas por 24 horas. Las características de rendimiento del método se probaron estadísticamente, revelando una óptima linealidad, lo que fue corroborado con evaluaciones estadísticas; así como la exactitud y la especificidad que demostraron que los excipientes no interfieren en la cuantificación de Memantina HCl en tabletas recubiertas de 5 mg. La precisión se demostró con los estudios de repetibilidad y precisión intermedia, cuyos valores se encuentran dentro de los intervalos de confianza. “Mediante los estudios realizados se estableció que las características de desempeño analítico cumplen con los requisitos para la aplicación analítica propuesta; siendo confiable para ser utilizado en la comprobación de las especificaciones de calidad” (5).

### **2.1.2 A nivel Internacional**

1.- Cárdenas Castañeda D. **“Validación de un método UV-VIS para la cuantificación de fenoles totales en Jarabe Vimang”** Cuba-2006: Mediante esta investigación se realizó la validación de un método espectrofotométrico UV-VIS para la determinación de fenoles totales en el jarabe Vimang 5%. Se evaluaron los parámetros de linealidad, precisión, (expresada como repetibilidad y productibilidad), exactitud y selectividad. Concluyéndose que en el método analítico propuesto se demostró la proporcionalidad y linealidad en el intervalo estudiado, con un coeficiente de correlación  $r= 0,997$  , los coeficientes de variación obtenidos en los estudios de repetibilidad y reproductibilidad estuvieron por debajo del límite máximo establecido (1,5% y 2% respectivamente) y no influyó en la precisión, el porcentaje medio de recuperación no difirió significativamente del 100% por lo que fue exacto y fue

selectivo porque mediante la comparación de los espectros del jarabe recién preparado, degradado y placebo no se evidenció que los productos de degradación interfirieron en el análisis de fenoles (6).

**2.-Mora C., Tello M. y Martínez F. “Validación de una metodología analítica para la cuantificación de Naproxeno en estudios de reparto líquido/líquido mediante espectrofotometría ultravioleta”, Colombia-2006:** Se realizó la validación de la metodología analítica para la cuantificación de Naproxeno (NAP) en medios acuosos de pH 1,2 y fuerza iónica  $0,15 \mu \text{ mol L}^{-1}$  y de pH 7,4 y  $0,15 \mu \text{ mol L}^{-1}$ , los cuales son empleados en estudios de la transferencia de este fármaco entre fases líquidas inmiscibles. El método analítico fue la espectrofotometría UV, en razón de que el NAP presenta en su estructura molecular grupos cromóforos compatibles (naftilo y carbonilo), los cuales permiten obtener una adecuada absorción en la región UV. Los parámetros validados en cada uno de los sistemas buffer fueron: especificidad, linealidad, repetibilidad del instrumento de medida y del método, y precisión intermedia. Adicionalmente se presentaron los resultados del reparto de NAP en diferentes sistemas líquido/líquido a  $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$  a los dos valores de pH. Finalmente, de todo lo expuesto anteriormente puede concluirse que “el método propuesto en esta investigación es adecuado para la cuantificación de este fármaco en los dos buffers utilizados y, por tanto, resulta útil en el estudio de los coeficientes de distribución en los sistemas de reparto evaluados” (7).

## **2.2 Bases Teóricas**

### **2.2.1 Validación de Métodos**

**2.2.1.1 Concepto:** La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método

cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas (8). Está implícita la necesidad de evaluar las capacidades de desempeño del método y es un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados por dicho método son confiables (9). Cuando se realiza la validación de un método por parte del laboratorio, lo que se busca es poder determinar con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos. En este sentido, es importante que para el proceso de validación se asigne a un responsable de realizar dicha tarea. De manera que, la validación se efectúe en forma metódica, ordenada, trazable y confiable (10).

La validación de procedimientos analíticos requiere: Instrumentos calificados y calibrados, métodos documentados, patrones de referencia confiables, analistas calificados, integridad de la muestra (11).

El protocolo de validación para un método analítico debe especificar: El propósito y el alcance, responsabilidades y competencias del equipo de trabajo, método de ensayo normalizado y documentado, lista de materiales y equipos, las características de desempeño que se evaluarán: especificidad, linealidad, entre otros y el procedimiento para evaluarlas, análisis estadístico o fórmulas y el criterio de aceptación para cada parámetro de desempeño (11).

Un método debe validarse cuando sea necesario verificar que sus parámetros de desempeño son adecuados para el uso en un problema analítico específico. Los siguientes son ejemplos que requieren de una validación como: un nuevo método desarrollado para un problema específico, un método ya establecido revisado para incorporar mejoras o extenderlo a un nuevo problema, cuando el control de calidad indica que un método ya establecido está cambiando con el tiempo, un

método establecido usado en un laboratorio diferente o diferentes analistas o diferente instrumentación, para demostrar la equivalencia entre un método nuevo y uno de referencia (12).

El objetivo de la validación de un método analítico es dejar evidencia, mediante documentación, del cumplimiento de las condiciones de exactitud, precisión y confiabilidad, así como de la integridad y recuperabilidad de los resultados de los ensayos efectuados. De este modo queda demostrado que se puede confiar en un método para producir el resultado esperado dentro de límites definidos (13).

2.2.1.2 Tipos de Validación: La validación de proceso se clasifica atendiendo al momento en que se realiza la validación en relación con la producción, puede ser prospectiva, concurrente, retrospectiva o revalidación (14)

1.- La validación prospectiva: se aplica sobre un producto nuevo involucra una fase experimental, se realiza en conjunto con el desarrollo de nuevos productos y procesos. Se hace antes de una fabricación convencional. Se lleva a cabo durante la etapa de desarrollo y es el resultado de un análisis de riesgo en el proceso productivo. También puede realizarse cuando se prevé efectuar cambios en el proceso de fabricación que pueden afectar las características del producto. (15)

2.- La validación concurrente es la forma de validación que se lleva a cabo durante la producción normal. Es el establecimiento documentado de que un proceso específico cumple con su propósito. Para que este método sea efectivo es necesario que los aspectos críticos hayan sido evaluados en la etapa de desarrollo. Los tres primeros lotes de producción deben ser

seguidos y controlados. La evaluación de los resultados es empleada para establecer la naturaleza y las especificaciones subsecuentes de los controles del proceso y del producto final. La validación concurrente, combinada con otros análisis, incluyendo la estabilidad, debe efectuarse durante toda la vida en producción del medicamento. (14, 15)

3.-La validación retrospectiva: consiste en establecer una evidencia documentada de la idoneidad de un producto o proceso basándose en las evaluaciones de los datos históricos acumulados existentes. Es la forma de validación que mira atrás a las experiencias obtenidas durante la producción; se sustenta en la condición de que la composición, los procedimientos y el equipamiento permanezcan sin cambios, y que la experiencia con la instalación y los resultados del control de procesos y del producto final sean evaluados. Se compilan los resultados de los análisis y se determina si el proceso se encuentra dentro de los límites permisibles (14, 16).

4.- La revalidación: es necesaria para asegurar que cualquier cambio introducido intencionalmente o no, no varíe la consistencia del proceso de producción, lo que permitirá que no existan variaciones en la calidad del producto. La revalidación puede ser clasificada en dos grandes categorías: revalidación en casos de cambios y revalidación periódica. La revalidación en casos de cambios debe ser realizada después de cualquier cambio que afecte las características establecidas del producto. Estos cambios pueden incluir las materias primas, los materiales de envase, los procesos de producción, el equipamiento, los controles del proceso,

las áreas de producción, o los sistemas de apoyo (agua, vapor, entre otros). La revalidación periódica es necesaria incluso si no se han introducido cambios intencionales porque se pueden producir cambios en los procesos aun en los casos en que operadores experimentados trabajen correctamente de acuerdo a los métodos establecidos, el equipamiento durante su uso puede producir cambios graduales (14).

2.2.1.3 Etapas de la validación: La validación transita por cuatro etapas o fases que son: la calificación de diseño (CDi), calificación de la instalación (CI), calificación de la operación (CO), y calificación del desempeño (CD).

1.- La calificación de diseño (CDi) es evidencia documentada de que las instalaciones, sistemas de apoyo, equipos y procesos hayan sido diseñadas en correspondencia con los requerimientos de las Buenas Prácticas. Así como también se debe incluir factores que servirán de apoyo para las etapas posteriores de la validación. En el protocolo de evaluación correspondiente al diseño en proyecto están comprendidos todos los criterios de calidad a cubrir planteados de la manera más objetiva y concreta posible.

Una vez que el proyecto quedo concluido a nivel de diseño, se documentara en el reporte de validación de manera que los requisitos de calidad queden cubiertos en esa etapa (18, 19).

2.- La calificación de la instalación, (CI) es la evidencia documentada de que las instalaciones, sistemas de apoyo, equipos y procesos hayan sido construidas e instaladas en correspondencia con sus especificaciones

de diseño. Estas especificaciones pueden ser: descripción de equipo y su capacidad de trabajo, información de fabricante, información de mantenimiento, lista de procedimiento de operación, lubricantes, especificaciones del sistema de apoyo crítico, características de los sistemas de control y monitoreo, planos de la instalación y diseño entre otros. Se debe establecer por evidencia objetiva que todos los aspectos claves del equipo de proceso y la instalación de sistemas de proceso y la instalación de sistemas auxiliares cumplan con las especificaciones aprobadas del fabricante, y las recomendaciones del proveedor del equipo (15, 18).

3.- La calificación de la operación (CO) es la evidencia documentada de que las instalaciones, sistemas de apoyo, equipos y procesos operen en correspondencia con sus especificaciones de diseño. Demuestra que el sistema, maquinaria y/o equipo involucrado opera correctamente una vez que se ha concluido la calificación de la instalación. Establecer por medio de evidencia objetiva los límites de control de proceso y los niveles de acción que resultan en un producto que cumpla con todos los requerimientos predeterminados (15, 17, 18).

4.- La calificación del desempeño (CD) Establecer por medio de evidencia objetiva que los procesos, bajo condiciones anticipadas, producen de manera consistente un producto que cumple con todos los requerimientos predeterminados. Demuestra la efectividad y reproductibilidad del proceso bajo condiciones límites de operación (15, 18).

### 2.2.1.3 Parámetros de Validación

1.- Linealidad: es su capacidad de producir resultados que son directamente proporcionales o mediante una transformación matemática bien definida se convierten directamente proporcionales a la concentración de analito dentro de un intervalo dado. La linealidad generalmente se expresa en función de la varianza alrededor de la pendiente de la recta de regresión calculada, según una relación matemática establecida, a partir de los resultados obtenidos mediante el análisis de muestra con diferentes concentraciones de analito. Esta relación matemática se expresa de la siguiente manera:

#### **Cálculo de la recta de regresión:**

Ecuación de la Recta:

$$y = bx + a$$

Dónde:

X: Concentración de analito

Y: Valor de la respuesta en área de pico

b : Valor de la pendiente de la recta

a : Valor del intercepto de la recta con eje "y"

El rango de un método analítico es el intervalo entre los niveles superior e inferior del analito, incluyendo estos valores, que se ha demostrado son determinados con precisión, exactitud y linealidad, empleando el método tal cual está escrito. La linealidad de un método analítico se determina mediante el tratamiento matemático de los resultados obtenidos a partir del análisis de muestras con concentraciones de analito a lo largo del rango propuesto por el método. El rango del método se valida comprobando que el método analítico proporciona una precisión, exactitud y linealidad aceptables (20).

2.- Exactitud: La exactitud de un método analítico es la proximidad entre los resultados, obtenidos por ese método y el valor real. La exactitud puede a menudo expresarse como un porcentaje de recuperación, por medio de la valoración de cantidades conocidas agregadas de analitos. Representa el grado en que un método analítico es exacto para los fines propuestos. Para formulaciones como tabletas, esto puede significar una evaluación potencial de la interacción del principio activo con los excipientes en un diluyente. Para el análisis de un producto farmacéutico la exactitud es evaluada por el análisis de una mezcla con cantidades conocidas de componentes.

Entre los procedimientos para determinar la exactitud de un método de análisis cabe citar:

- Comparar el método propuesto con otro cuya exactitud haya sido ya establecida.
- Comprobar este parámetro, utilizando como muestra un patrón de calidad certificada.
- Aplicar el método analítico a una muestra o mezcla de excipientes a las que se añaden cantidades conocidas de un analito.

Mediante este último método se agregan cantidades conocidas de analito o mezcla de excipientes, tanto por encima como por debajo del nivel normal previsto. A partir de los resultados obtenidos luego de aplicar el método propuesto, se calcula la exactitud como el porcentaje de analito recuperado por medio de la valoración mediante la siguiente fórmula (20):

$$\%R = \frac{X_h \times 100}{X_a}$$

Dónde:

%R: Porcentaje de recuperación

Xh : Cantidad de analito hallado

Xa : Cantidad de analito añadido

Donde el RSD de la cantidad de analito añadido con la cantidad de analito recuperado debe ser menor al 2%.

3.- Precisión: es el grado de concordancia o de dispersión de los resultados de la prueba, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a muestras múltiples de una muestra homogénea. Es la medida de cuán cerca están los valores unos de otros para un número de mediciones bajo las mismas condiciones analíticas. La precisión de un método analítico generalmente se expresa como la desviación estándar relativa (RSD) cuyo valor debe ser menor o igual al 2%. La ICH (International Conference of Harmonization), se utilizan dos componentes para definir la precisión:

a.-Repetibilidad o Capacidad de Repetición: expresa la precisión del método de análisis cuando es realizado por un mismo analista bajo condiciones iguales como equipo, reactivo e intervalos de tiempo. La repetibilidad mide las variaciones dentro de un mismo laboratorio. Se determina analizando un número significativo de muestras tomando de un lote homogéneo.

Los resultados se acompañan del valor medio, desviación estándar que debe ser menor o igual al 2%, coeficiente de variación deben ser menores o iguales al 1,5%

b.-Precisión intermedia: expresa la precisión del método de análisis cuando es realizado por diferentes analistas y bajo condiciones ligeramente diferentes, tales como

distintos días, diferentes instrumentos, entre otros. La precisión intermedia mide las desviaciones interlaboratorios y se determina analizando un número significativo de muestras, tomadas de un lote homogéneo, en diferentes días, por distintos analistas y utilizando distintos equipos, aplicando el mismo procedimiento analítico (20).

4.- Especificidad: Este parámetro se relaciona con el grado en que otras sustancias interfieren en la identificación y, si procede, en la cuantificación de los analitos de que se trate. Mide la capacidad del método para identificar/cuantificar los analitos en presencia de otras sustancias, endógenas o exógenas, en una muestra de la matriz en las condiciones exigidas por el método. La especificidad se determina añadiendo materiales que podrían encontrarse en la muestra. Por ejemplo, para hacer un ensayo de la especificidad de un método inmunológico aplicado a especímenes biológicos pueden utilizarse sustancias que potencialmente reaccionen entre sí; una prueba de la especificidad de un método visual sería añadir sustancias interferentes que puedan ocultar o enmascarar la reacción de color; un método cromatográfico para determinar la concentración de drogas ilícitas en muestras clínicas no debe admitir interferencias por parte de los fármacos que quepa esperar que se utilicen simultáneamente. La especificidad depende de la concentración y debe determinarse el margen de error de calibración en su nivel más bajo. La validación debe garantizar el buen funcionamiento del método, y que éste distingue los efectos de las impurezas, las sustancias que reaccionan entre sí, que podrían estar presentes en la matriz (20).

5.-Robustez: es la medida de su capacidad para permanecer inafectado por pequeñas variaciones deliberadas en el método y provee un indicio de su veracidad durante su uso normal (20).

## 2.2.2 Espectrofotometría Ultravioleta Visible

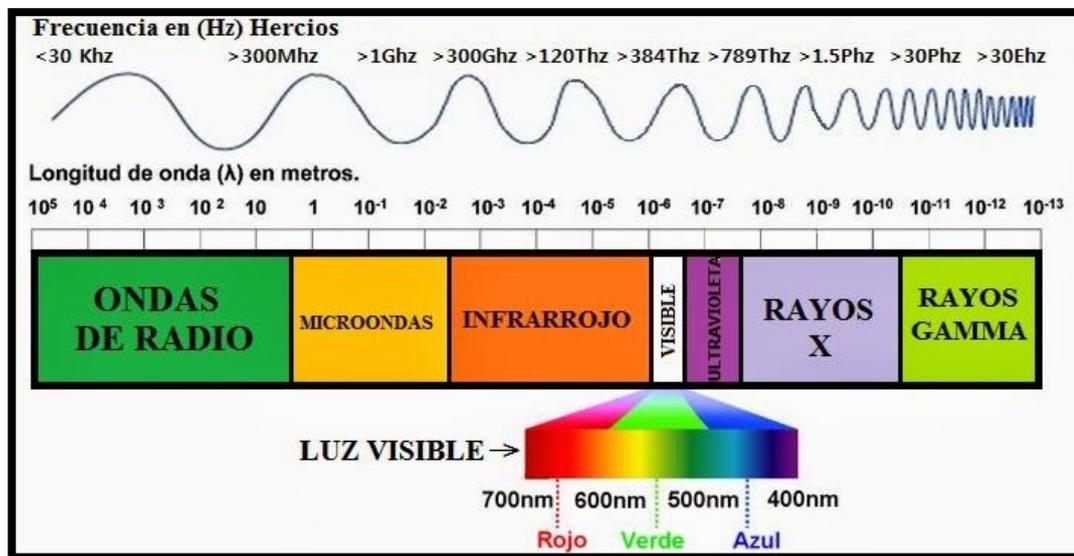
2.2.2.1 Concepto: El estudio a nivel bioquímico de cualquier biomolécula requiere la utilización de técnicas analíticas que permitan su determinación cualitativa y cuantitativa, así como su caracterización físico-química y biológica. Uno de los métodos más sencillos, accesibles, útiles y utilizados es la espectroscopía, en general, y la espectroscopía ultravioleta-visible, en particular. Se pueden identificar y cuantificar biomoléculas en solución y en muestras biológicas, con el empleo de reactivos específicos que reaccionan con el compuesto a analizar y forman un producto coloreado que permite detectarlo en muestras complejas.

El fundamento de la espectroscopía se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las radiaciones dentro del espectro UV- visible. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica), por lo que dicha técnica constituye un valioso instrumento para la determinación y caracterización de biomoléculas. Las moléculas pueden absorber energía luminosa y almacenarla en forma de energía interna. Esto permite poner en funcionamiento ciclos vitales como la fotosíntesis en plantas y bacterias.

Cuando la luz (considerada como energía) es absorbida por una molécula se origina un salto desde un estado energético basal o fundamental, E1, a un estado de mayor energía (estado

excitado), E2. Y sólo se absorberá la energía que permita el salto al estado excitado. Cada molécula tiene una serie de estados excitados (o bandas) que la distingue del resto de moléculas. Como consecuencia, la absorción que a distintas longitudes de onda presenta una molécula -esto es, su espectro de absorción constituye una señal de identidad de la misma. Por último, la molécula en forma excitada libera la energía absorbida hasta el estado energético fundamental (21). En espectroscopía el término luz no sólo se aplica a la forma visible de radiación electromagnética, sino también a las formas UV e IR, que son invisibles. En espectrofotometría de absorbancia se utilizan las regiones del ultravioleta (UV cercano, de 195-400 nm) y el visible (400-780 nm). A continuación, se muestra en la figura 1 el espectro electromagnético (22).

**GRÁFICO Nº 1:** Espectro Electromagnético



**Fuente:** Fundamentos de la Espectroscopia UV-visible de Tony Owen

La región UV se define como el rango de longitudes de onda de 195 a 400 nm. Es una región de energía muy alta. Provoca daño al ojo humano, así como quemadura común. Los compuestos con dobles enlaces aislados, triples enlaces,

enlaces peptídicos, sistemas aromáticos, grupos carbonilos y otros heteroátomos tienen su máxima absorbancia en la región UV, por lo que ésta es muy importante para la determinación cualitativa y cuantitativa de compuestos orgánicos. Diversos factores como pH, concentración de sal y el disolvente- que alteran la carga de las moléculas, provocan desplazamientos de los espectros UV. La fuente de radiación ultravioleta es una lámpara de deuterio. En la región visible apreciamos el color visible de una solución y que corresponde a las longitudes de onda de luz que transmite, no que absorbe. El color que absorbe es el complementario del color que transmite. Por tanto, para realizar mediciones de absorción es necesario utilizar la longitud de onda en la que absorbe luz la solución coloreada. La fuente de radiación visible suele ser una lámpara de tungsteno y no proporciona suficiente energía por debajo de 320 nm (22). En la tabla 1 podemos apreciar los colores que se reflejan según las longitudes de onda

**TABLA Nº 1:** Transmisión de colores según longitudes de onda en la región Ultravioleta visible

| <b>Longitud de onda aproximada</b> | <b>Color de luz que se absorbe</b> | <b>Color de luz que se refleja o ve</b> |
|------------------------------------|------------------------------------|---|
| 390 – 435                          | Violeta                            | Amarillo verdoso                        |
| 435 – 490                          | Azul                               | Amarillo                                |
| 490 – 580                          | Verde                              | Rojo                                    |
| 580 – 595                          | Amarillo                           | Azul                                    |
| 595 – 650                          | Naranja                            | Azul verdoso                            |
| 650 – 780                          | Rojo                               | Verde azulado                           |

**Fuente:** Fundamentos de la Espectroscopia UV-visible de Tony Owen

**Elaboración:** Propia

2.2.2.2 Transmitancia y Absorbancia: Cuando un rayo de luz de una determinada longitud de onda de intensidad incide perpendicularmente sobre una disolución de un compuesto químico que absorbe luz o cromóforo, el compuesto absorberá una parte de la radiación incidente ( $I_a$ ) y dejará pasar el resto ( $I_t$ ), de forma que se cumple:  $I_o = I_a + I_t$

1.- La Transmitancia (T) de una sustancia en solución es la relación entre la cantidad de luz transmitida que llega al detector una vez que ha atravesado la muestra,  $I_t$ , y la cantidad de luz que incidió sobre ella,  $I_o$ , y se representa normalmente en tanto por ciento:  $\% T = I_t/I_o \times 100$ . La Transmitancia nos da una medida física de la relación de intensidad incidente y transmitida al pasar por la muestra. La relación entre  $\%T$  y la concentración no es lineal, pero asume una relación logarítmica inversa.

2.- La absorbancia (A) es un concepto más relacionado con la muestra puesto que nos indica la cantidad de luz absorbida por la misma, y se define como el logaritmo de  $1/T$ , en consecuencia:  $A = \log 1/T = -\log T = -\log I_t/I_o$ . Cuando la intensidad incidente y transmitida son iguales ( $I_o = I_t$ ), la Transmitancia es del 100% e indica que la muestra no absorbe a una determinada longitud de onda, y entonces  $A$  vale  $\log 1 = 0$ .

La cantidad de luz absorbida dependerá de la distancia que atraviesa la luz a través de la solución del cromóforo y de la concentración de éste (21).

2.2.2.3 Ley de Lambert-Beer: Esta ley expresa la relación entre absorbancia de luz monocromática (de longitud de onda fija) y concentración de un cromóforo en solución:  $A = \log I/I_o = \epsilon \cdot c \cdot l$ . La absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración a mayor número de moléculas mayor

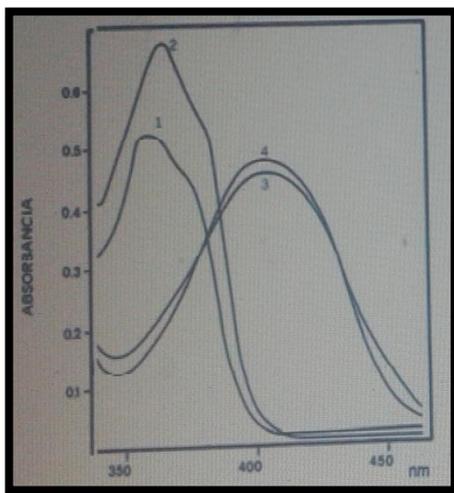
interacción de la luz con ellas; también depende de la distancia que recorre la luz por la solución a igual concentración, cuanto mayor distancia recorre la luz por la muestra más moléculas se encontrará; y por último, depende de  $\epsilon$ , una constante de proporcionalidad denominada coeficiente de extinción que es específica de cada cromóforo. Como  $A$  es adimensional, las dimensiones de  $\epsilon$  dependen de las de  $c$  y  $l$ . La segunda magnitud ( $l$ ) se expresa siempre en cm mientras que la primera ( $c$ ) se hace, siempre que sea posible, en M, con lo que las dimensiones de  $\epsilon$  resultan ser  $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ .

Este coeficiente así expresado, en términos de unidades de concentración molar (o un submúltiplo apropiado), se denomina coeficiente de extinción molar ( $\epsilon_M$ ). Cuando, por desconocerse el peso molecular del soluto, la concentración de la disolución se expresa en otras unidades distintas de M, por ejemplo,  $g\cdot L^{-1}$ , las dimensiones de  $\epsilon$  resultan ser distintas, por ejemplo  $g^{-1}\cdot L\cdot cm^{-1}$ , y al coeficiente así expresado se denomina coeficiente de extinción específico ( $\epsilon_s$ ). La ley de Lambert-Beer se cumple para soluciones diluidas; para valores de  $c$  altos,  $\epsilon$  varía con la concentración, debido a fenómenos de dispersión de la luz, agregación de moléculas, cambios del medio, entre otros (21).

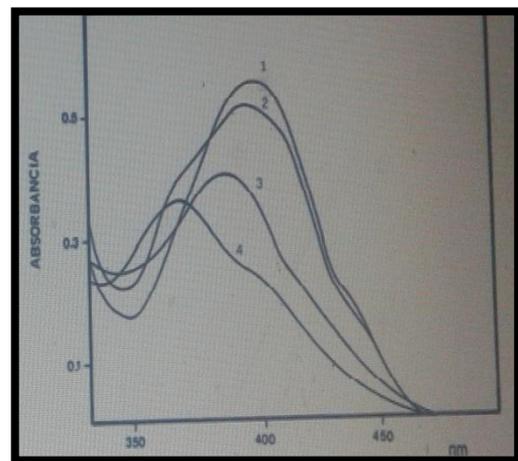
2.2.2.4 Obtención de un espectro de absorción: El espectro de absorción es una representación gráfica que indica cantidad de luz absorbida ( $\epsilon$ ) a diferentes valores de  $\lambda$ . A partir de una solución diluida de un compuesto, cuya absorbancia máxima entra dentro del rango de medida del espectrofotómetro, se verá el valor de absorbancia a diferentes longitudes de onda frente a un blanco que contenga el disolvente de la solución de la muestra a caracterizar. A partir del espectro de absorción se obtendrá el valor de  $\lambda$  al que el compuesto presenta la mayor absorbancia ( $\lambda_{max}$ ). Dicho  $\lambda$  se utilizará a la hora de hacer

determinaciones cualitativas y cuantitativas del compuesto. El espectro de absorción de un cromóforo depende, fundamentalmente, de la estructura química de la molécula. No obstante, hay una gran cantidad de factores que originan variaciones en los valores de  $\lambda_{\text{max}}$  y  $\epsilon_{\text{M}}$ , entre los que se incluye el pH, la polaridad del solvente o moléculas vecinas y la orientación de los cromóforos vecinos; y cada uno afecta de forma particular. Por ejemplo, variaciones originadas por cambios de pH son debidas al efecto de éste sobre la ionización del compuesto (21). A continuación, en la Figura 2 se muestran como ejemplo los espectros de absorción de HNTS (reactivo empleado para la determinación de especies oxidantes) y comprobándose que por espectrofotometría se puede seguir el efecto que ejercen el pH y los oxidantes (22).

**GRÁFICO Nº 2:** Espectros de absorción de HNTS y el efecto que ejercen el pH y los oxidantes



*Efecto del pH en la absorción de HNTS.*  
Espectros 1 y 2 en medio ácido (máximo de absorción a 370 nm); espectros 3 y 4 en medio básico (máximo a 410 nm).

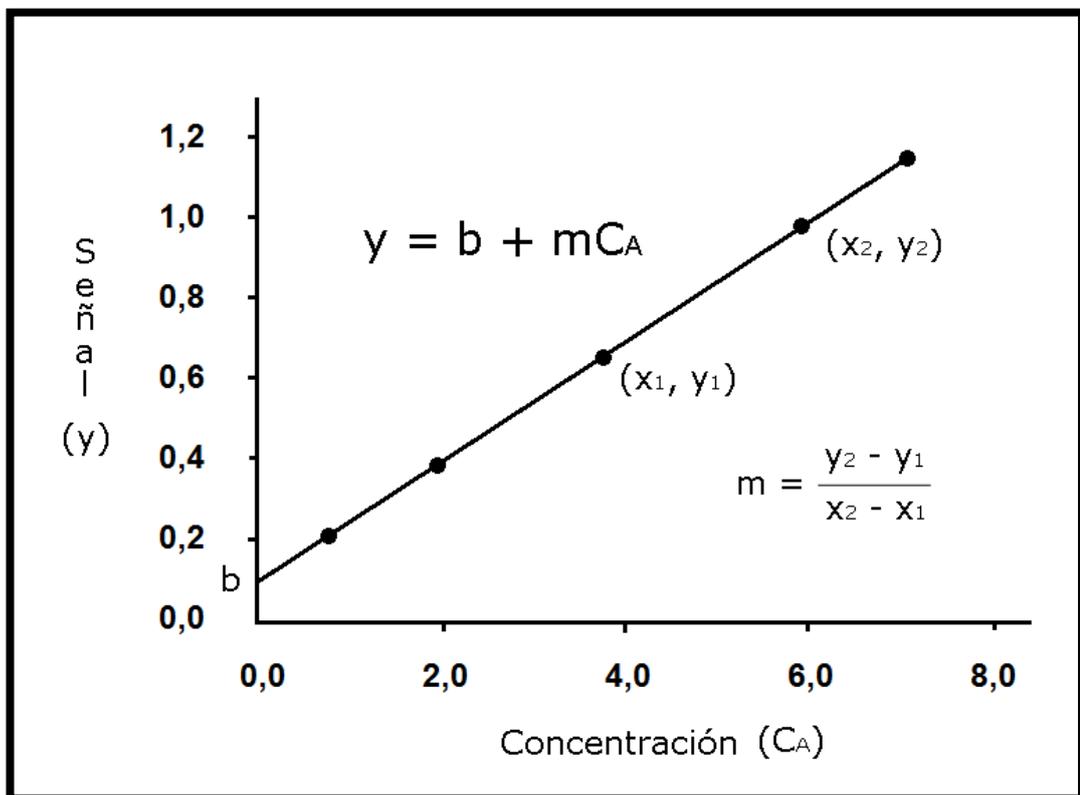


*Desplazamiento del máximo de absorción y descenso de absorbancia cuando el HNTS se incubó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a distintos tiempos (0, 5, 10 y 15 minutos).*

**Fuente:** Fundamentos de la Espectroscopia UV-visible de Tony Owen

2.2.2.5 Curvas de calibrado: Para obtener una curva de calibrado de un compuesto se preparan soluciones de diferentes concentraciones del mismo, determinándose para cada una de ellas el valor de absorbancia a  $\lambda_{\max}$ . Estos valores de absorbancia se representan en el eje de las ordenadas (eje de y) y los de concentración en el eje de abscisas (eje de x). Se observará que, a bajas concentraciones, el aumento de concentración se corresponde con un incremento lineal en la absorbancia (zona de cumplimiento de la ley de Lambert-Beer). A concentraciones altas la linealidad se pierde y se observa que la línea se aplana, por lo que las medidas son poco fiables. La representación de Lambert-Beer,  $A = \epsilon \cdot c \cdot l$ , nos permitirá calcular el valor del coeficiente de extinción molar, que corresponde a la pendiente de la recta (22).

**GRÁFICO Nº 3:** Curva de Calibración



**Fuente:** Fundamentos de la Espectroscopia UV-visible de Tony Owen

2.2.2.6 Tipos de Espectrofotometría: en la Tabla 2 se muestra los principales tipos de espectrofotometrías agrupadas según el tipo de interacción luz-molécula (absorción o emisión) y según la zona del espectro en la que se trabaja (22).

**TABLA N° 2:** Tipos de Espectrofotometría

|           |           |  |
|-----------|-----------|--|
| ABSORCIÓN | Molecular | UV-VIS (Ultravioleta visible)<br>IR (Infrarrojo)<br>RMN (Resonancia Magnética Nuclear) |
|           | Atómica   | Llama EAA<br>Electrotérmica (GF)   |
| EMISIÓN   | Atómica   | Llama (EAA)<br>Plasma (ICP)  |
|           | Molecular | Fluorescencia (FS, XRF)  |
| OTROS     |           | Espectroscopia de Masas (EM)<br>Turbimetría<br>Refractometría<br>Polarimetría          |

**Fuente:** Fundamentos de la Espectroscopia UV-visible de Tony Owen

**Elaboración:** Propia

### 2.2.2.7 Características del Equipo de Espectrofotometría UV-VIS:

Se distinguen dos tipos de aparatos:

- Fotómetro o Colorímetro: se caracterizan porque utilizan filtros que solo permiten el paso de una determinada longitud de onda.
- Espectrofotómetros: utilizan cromadores. Con ellos se obtiene un haz de luz monocromático cuya longitud de onda se varía a voluntad. Los monocromadores pueden ser de dos tipos: prismas y redes de difracción.

Las principales partes de un espectrofotómetro son:

1.- Fuente de luz: proporciona energía radiante en forma de luz visible o no visible.

Tipos de lámparas:

- Lámparas de filamento de tungsteno: se utilizan para longitudes de onda del espectro visible y el ultravioleta próximo. Son fuentes de un espectro continuo de energía radiante entre 360-950 nm.
- Lámparas de filamentos de haluros de tungsteno: son de mayor duración y emiten energía radiante de mayor intensidad.
- Lámparas de Hidrógeno y Deuterio: producen un espectro continuo en la región ultravioleta entre 220-360 nm.
- Lámparas de vapores de Mercurio: Emiten un espectro discontinuo o espectro de líneas que se utilizan para calibración de longitudes de onda, se emplean solo para espectrofotómetros y cromatografía HPLC.

2. Rendija de entrada: tiene como función reducir al máximo la luz difusa y evitar que la luz dispersa entre en el sistema de selección de longitud de onda.

3. Monocromadores. Pueden ser:

-Prismas: son fragmentos con forma de cuña de un material que permite el paso de la luz. Ej. De vidrio para trabajar en el espectro visible o cuarzo para trabajar en el ultravioleta lejano.

\*Redes de difracción: son un gran número de líneas paralelas situadas a distancias iguales entre sí y son hendiduras sobre un vidrio o una superficie metálica. Cada una de estas hendiduras se comporta como un pequeño prisma.

4. Rendija de salida: tiene como función impedir que la luz difusa atraviese la cubeta de la muestra, que provocaría desviaciones a la Ley de Beer.

5. Cubeta: es el recipiente donde se coloca la muestra para la medición. Pueden ser de distintos tipos y tamaños (cuadradas, rectangulares, redondas). Las cubetas deben ser tan claras o transparentes como sea posible, sin impurezas que puedan afectar a una lectura espectroscópica. Se obtienen mejores resultados usando cubetas de bordes paralelos. Si se utilizan cubetas redondas se deben marcar e introducir en el aparato siempre en la misma posición. Suelen estar fabricadas en vidrio o en plástico. En este trabajo utilizaremos las cubetas de cuarzo.

- Cuarzo: tienen trayecto interno de 1cm, pueden utilizarse con fuentes luminosas que producen luz visible (longitud de onda de 400 a 800nm) o para la región del ultravioleta (bajo de 200 a 400 nm)

6. Detector. Puede ser de dos tipos:

➤ Fococélulas o células fotovoltaicas: Es una lámina de Cobre sobre la que se extiende una capa de Selenio o de Óxido de Cobre. A esto se le conoce como

semiconductor. Sobre el semiconductor hay una capa de metal transparente que sirve de electrodo. La luz incide sobre el Selenio y éste desprende electrones, que pasan a la placa de Cobre originando una diferencia de potencial por existir carga negativa sobre el Cobre y positiva sobre el Selenio. El conjunto se conecta a un amperímetro que señala el paso de corriente.

Características: son resistentes; económicas; sensibles desde el ultravioleta hasta los 1.000 nm de longitud de onda; no se requiere batería externa, ni vacío; la corriente producida es directamente proporcional a la energía que llega y tienen “efecto fatiga”, es decir, que presentan una subida inicial de corriente, que luego decrece progresivamente hasta el equilibrio. Por eso hay que esperar entre 30-60 segundos entre una lectura y otra.

➤ Fototubos multiplicadores: es un tubo que contiene un cátodo que emite electrones de forma proporcional a la energía que incide sobre él. Tiene un ánodo que recoge los electrones y la corriente se multiplica varias veces al chocar los electrones sobre sucesivos ánodos que van teniendo un voltaje superior al precedente. La señal se amplifica en cientos o miles de veces.

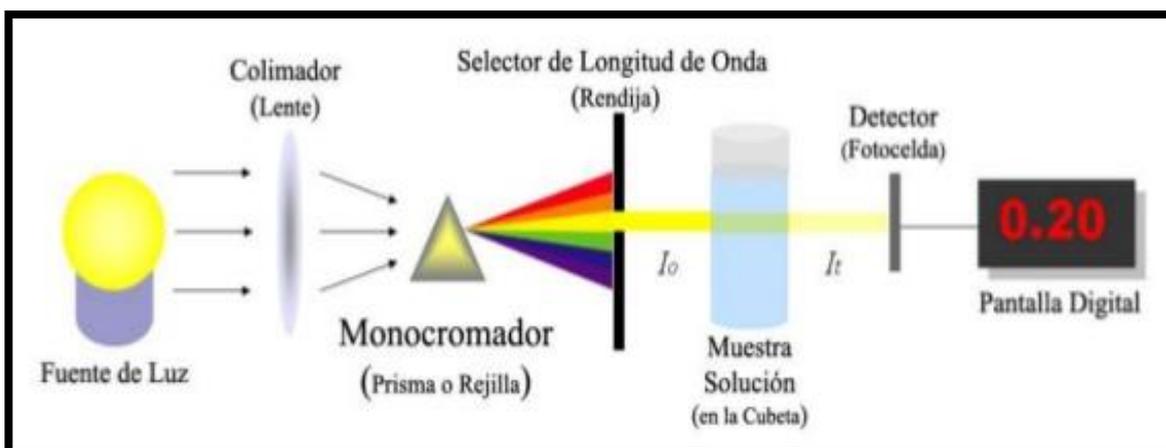
Características: el tiempo de respuesta es muy rápido, no tienen “efecto fatiga” tan altos como la anterior y son muy sensibles.

7. Medidor: son sistemas de lectura de la energía eléctrica que recoge el detector y que puede ser lectura directa (se utiliza una célula fotovoltaica) o puede ser amplificadores de señal como en el caso del fototubo multiplicador. Los actuales aparatos incorporan lectura digital y cálculos

automáticos de concentraciones con relación a las curvas de calibración (22).

A continuación en la Figura 3 se muestra las partes de un espectrofotómetro.

**GRÁFICO Nº 4:** Partes de un Espectrofotómetro Ultravioleta visible



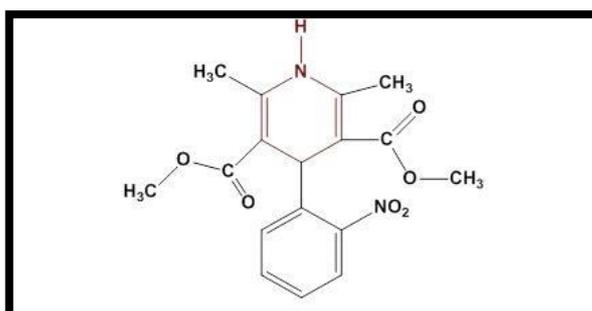
**Fuente:** Fundamentos de la Espectroscopia UV-visible de Tony Owen.

### 2.2.3 Nifedipino

2.2.3.1 Descripción: El nifedipino, un derivado de 1,4-dihidropiridina de segunda generación, es una antagonista de calcio que bloquea la entrada de iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior de la célula dando lugar, principalmente, a efectos vasodilatadores periféricos y coronarios). El nifedipino, junto con otros antagonistas del calcio, se ha utilizado frecuentemente con el fin de estudiar los mecanismos reguladores calcio dependientes (23).

2.2.3.2 Estructura: El nifedipino presenta la siguiente estructura química:

**GRÁFICO Nº 5:** Fórmula estructural del Nifedipino (24).



**Fuente:** Ficha de Datos de Seguridad ACOFARMA Conforme al Reglamento (CE) N° 1907/2006

Nombre químico : 2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato de dimetilo.

Fórmula molecular: C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>

Peso molecular : 346,33

Punto de fusión : 172 – 174 °C

Características : El Nifedipino es un polvo cristalino, amarillo.

La relación estructura-actividad que se ha observado en los fármacos que actúan bloqueando los canales de calcio, han permitido una mejor comprensión de su interacción con dicho canal. En particular, se han estudiado con detalle los requerimientos estructurales que conducen a una actividad óptima en las 1,4- dihidropiridinas, como es el caso del nifedipino. Así, se ha observado que el anillo 1,4- dihidropiridina al igual que el hidrógeno situado sobre el átomo de nitrógeno son esenciales para su actividad. La sustitución de los agrupamientos éster por sustituyentes aceptores de electrones provoca una disminución en su actividad. El grupo nitro se asocia con una actividad estimulante y se ha sugerido que las diferencias entre los puentes de hidrogeno, que se establecen con participación de los grupos éster y nitro, son los que inducen a una conformación preferentemente cerrada (bloqueante) o abierta (estimulante) (25).

### 2.2.3.3 Propiedades Físicas y Químicas (24)

**TABLA N° 3:** Propiedades Físicas y Químicas del Nifedipino

| Estado Físico                   | Sólido         |                         |
|---------------------------------|----------------|-------------------------|
| Color                           | Amarillo limón |                         |
| Olor                            | Inodoro        |                         |
| Valor pH (suspensión acuosa 1%) | Aprox. 6.0     |                         |
| Solubilidad                     | Agua (20°C)    | Prácticamente insoluble |
|                                 | Etanol         | Ligeramente soluble     |
|                                 | Cloroformo     | Soluble                 |
|                                 | Éter           | Prácticamente insoluble |

**Fuente:** Ficha de Datos de Seguridad ACOFARMA Conforme al Reglamento (CE) N° 1907/2006

**Elaboración:** Propia

#### 2.2.3.4 Propiedades Farmacológicas

1.-Propiedades farmacodinámicas: Grupo Farmacoterapéutico: derivados de la dihidropiridina, código ATC: C08 CA05 El nifedipino es un calcioantagonista del grupo de las dihidropiridinas que inhibe el flujo de iones calcio al tejido miocárdico y al tejido muscular liso de las arterias coronarias y de los vasos periféricos. De ello resultan los siguientes efectos farmacológicos y terapéuticos: El nifedipino dilata las arterias coronarias mejorando el suministro de oxígeno al miocardio al aumentar el flujo sanguíneo coronario. Al mismo tiempo, reduce las necesidades de oxígeno del miocardio por disminución de la postcarga. Con el empleo continuado de nifedipino puede prevenirse el desarrollo de nuevas lesiones ateroscleróticas. El nifedipino dilata los vasos arteriales periféricos, reduciendo la resistencia periférica y disminuyendo la presión arterial elevada (24).

2.- Propiedades farmacocinéticas El nifedipino se absorbe con rapidez y casi completamente (aprox. 100%). Sin embargo, la biodisponibilidad del nifedipino administrado por vía oral (formulación de liberación inmediata) es del 45-56% debido a un efecto de 1er. paso. La administración simultánea con alimentos retrasa, pero no reduce su absorción. El nifedipino se metaboliza en el hígado y pared intestinal, principalmente por procesos oxidativos. Los metabolitos

resultantes no presentan actividad farmacodinámica. El nifedipino se excreta principalmente por vía renal en forma de metabolitos, y alrededor del 5-15% por vía biliar con las heces. El principio activo inalterado sólo se recupera en trazas (por debajo de 0,1%) en la orina. Durante el tratamiento a largo plazo con la dosis usual no se ha observado acumulación del principio activo (24).

#### 2.2.3.5 Contraindicaciones

El uso de nifedipino para el tratamiento de la hipertensión en pacientes de más 70 años ha sido asociado a un aumento del riesgo de mortalidad 4 veces mayor en comparación con otros antihipertensivos (como los beta-bloqueantes, los inhibidores de la ECA o el verapamilo). En los ancianos los niveles plasmáticos del nifedipino son superiores a los de la población en general, ocurriendo lo mismo en pacientes con insuficiencia hepática o cirrosis. Estos pacientes se deberán vigilar cuidadosamente para evitar la acumulación de nifedipino, con sus correspondientes efectos tóxicos.

El nifedipino se clasifica dentro de la categoría C de riesgo en el embarazo y solo debe utilizarse si los beneficios para el paciente son claramente superiores a los riesgos potenciales.

El nifedipino se excreta en la leche materna y podría causar hipotensión y taquicardia al lactante. No se aconseja la lactancia durante el tratamiento con nifedipino.

En base a la experiencia con otros calcioantagonista, no se administrará nifedipino conjuntamente con rifampicina (24).

#### 2.2.3.6 Efectos adversos

Vasculares: son frecuentes (10-25% de los pacientes) los relacionados con un exceso de vasodilatación periférica (mareos, cefalea, sofocos, rubor facial, edema periférico). Estos efectos son menores con las formas de liberación retardada porque proporcionan niveles plasmáticos menos variables.

Cardíacos: ocasionalmente hipotensión, palpitaciones, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio y edema pulmonar. Raramente taquicardia y angina de pecho. La taquicardia es un signo reflejo del sistema simpático en respuesta a la caída de la resistencia periférica y ocurre más acusadamente con las formas de liberación rápida.

Digestivos: ocasionalmente náuseas, diarrea, estreñimiento, dispepsia, dolor abdominal. Raramente vómitos.

Sistema nervioso: ansiedad, insomnio, somnolencia, astenia, parestesia.

Otros: erupción exantemática, prurito, urticaria, congestión nasal, tos, artralgias, calambres musculares, sudoración, hiperplasia gingival, aumento de peso (24).

### 2.3 Definición de términos básicos

Ensayo: Operación técnica realizada de acuerdo a un procedimiento específico, que consiste en la determinación cualitativa y/o cuantificación de una o más características (propiedades o principio activo) en un determinado producto, proceso o servicio.

Especificidad: Habilidad de evaluar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se puede esperar que estén presentes. Típicamente éstos pueden incluir impurezas, productos de degradación, la matriz, entre otros.

**Exactitud:** Expresa la cercanía entre el valor que es aceptado, sea como un valor convencional verdadero, sea como un valor de referencia aceptado y el valor encontrado (valor promedio) obtenido al aplicar el procedimiento de análisis un cierto número de veces.

**Límite máximo permitido (LMP):** Nivel máximo o tolerancia establecida para un analito en una reglamentación.

**Linealidad:** Habilidad del procedimiento analítico de obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra.

**Material de referencia certificado:** Material en el que los valores de una o más de sus propiedades están certificados por un procedimiento técnicamente validado, bien sea que este acompañado de un certificado u otra documentación emitida por un ente certificador.

**Método de ensayo validado:** Método de ensayo aceptado en el que se han llevado a cabo estudios de validación con el fin de determinar su precisión y fiabilidad para un propósito específico.

**Precisión:** expresa la cercanía de coincidencia entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea bajo condiciones establecidas. Puede considerarse a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

**Precisión intermedia:** Precisión obtenida dentro del laboratorio por diferentes analistas, diferentes equipos, días distintos con la misma muestra homogénea.

**Robustez:** Medida de la capacidad de un procedimiento analítico de permanecer inafectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y provee una indicación de su fiabilidad en condiciones de uso normales.

**Validación:** Verificación de determinados parámetros de un método en la que los requisitos especificados para estos, demuestran que el método es idóneo para un uso previsto.

## **CAPÍTULO III**

### **METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **3.1 Tipo de Investigación**

##### **3.1.1 Método**

Científico: ya que se generó objetivos, hipótesis y conclusiones que llevó a cabo la validación del método por Espectrofotometría Ultravioleta visible.

Analítico: ya que se analizaron cada parámetro de validación como linealidad, exactitud, precisión y robustez para la validación de la metodología.

Deductivo: porque del análisis obtenido de la muestra representativa que serán 20 tabletas de Nifedipino se elaboraron las conclusiones.

Cuantitativo: se evaluó las muestras de Nifedipino, de las cuales se obtuvieron resultados porcentuales y se analizaron mediante métodos estadísticos para obtener los resultados.

##### **3.1.2 Técnicas**

Observación: ya que se registraron, analizaron e interpretaron los datos obtenidos del análisis de Nifedipino a través de la lectura del espectrofotómetro para elaborar las conclusiones.

##### **3.1.3 Diseño**

Transversal: porque los datos se obtuvieron en un periodo de junio a agosto.

Descriptivo: porque se identificó la población de estudio, se definieron los objetivos, generaron hipótesis, definieron las variables, y se formularon conclusiones para realización de la validación del método por Espectrofotometría Ultravioleta visible.

#### **3.2 Población y Muestreo de la Investigación**

##### **3.2.1 Población.**

Tabletas de Nifedipino de 10mg distribuidas en el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen.

### 3.2.2 Muestra

20 tabletas de Nifedipino 10 mg dispensadas en el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen.

### 3.3 Variables e Indicadores

#### Variable Independiente (X)

Determinación de contenido de Nifedipino por Espectrofotometría UV-VIS

| VARIABLE (X)   | INDICADORES                                 |
|--|---|
| Determinación de contenido de Nifedipino por Espectrofotometría UV-VIS | Cumple (90-110% de la cantidad rotulada)    |
|  | No cumple (90-110% de la cantidad rotulada) |

#### Variable Dependiente (Y):

Validación del Método por Espectrofotometría UV-VIS

| VARIABLE              | INDICADORES |
|-----------------------|-------------|
| Validación del Método | Cumple      |
|                       | No cumple   |

### 3.4 Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos

#### 3.4.1 Técnica

##### PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

##### CONTENIDO

1. Objetivo
2. Alcance
3. Responsabilidad
4. Justificación
5. Calificación Instrumental
  - Espectrómetro
  - Balanza analítica
6. Validación del método
  - 6.1 Descripción del método analítico propuesto
    - 6.1.1 Materiales, reactivos y equipos
    - 6.1.2 Condiciones de trabajo
    - 6.1.3 Procedimiento analítico
    - 6.1.4 Cálculos
7. Desarrollo de los parámetros de validación
  - 7.1 Linealidad
  - 7.2 Exactitud
  - 7.3 Precisión (Repetibilidad y Precisión intermedia)
  - 7.4 Robustez

## **1.- OBJETIVO**

Demostrar que la técnica de Cuantificación de NIFEDIPINO de 10mg tableta por el método de Espectrofotometría Ultravioleta Visible, cumple con las exigencias dadas por la USP según los parámetros de la validación.

## **2. ALCANCE**

Análisis cuantitativo empleando el método de Espectrofotometría Ultravioleta Visible para el principio activo Nifedipino en la forma farmacéutica de tableta.

## **3. RESPONSABILIDADES**

Corresponde al analista que realizará los pasos establecidos en este protocolo.

## **4. JUSTIFICACIÓN**

La técnica por Espectrofotometría Ultravioleta Visible, es una técnica que por su naturaleza es muy fiable, es específica, selectiva y de muy buena exactitud.

## **5. CALIFICACION DEL INSTRUMENTO Y DE SU FUNCIONAMIENTO**

Los instrumentos empleados en la validación del método analítico son:

### **a) ESPECTROFOTÓMETRO ULTRAVIOLETA / VISIBLE**

Marca: Varian

Modelo: Cary 50

### **b) BALANZA ANALÍTICA**

MARCA : RADWAG

MODELO : AS 220.R2

SENSIBILIDAD: 0.0001g

CAPACIDAD : 200g

## **6. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO**

### **6.1 DESCRIPCION DEL METODO ANALITICO PROPUESTO**

#### **6.1.1 Materiales, reactivos, estándares y equipos.**

Materiales:

- Mortero y pilón
- Pipetas volumétricas de 50mL, 10mL, 5mL.

- Fiolas de 50mL, 100mL
- Embudos de vidrio

Otros:

- Papel filtro Whatman N°42
- Cubeta de cuarzo.
- Pipeteador
- Pizetas

Reactivos:

- Etanol 96%
- Metanol grado P.A.

Estándar:

Nifedipino

Lote: 0144-061A

Fecha de Expiración: 31 Julio 2017

Potencia: 99,9%

#### 6.1.2 Condiciones de trabajo

- Principio activo : NIFEDIPINO
- Especificaciones : 90 -110 % (Nifedipino)
- Técnica empleada: Espectrofotometría Ultravioleta Visible
- Condiciones Espectrofotométricas UV-VIS

Celda de cuarzo

Longitud de Onda 342 nm

Temperatura ambiente

6.1.3 Procedimiento analítico: Método espectrofotométrico ultravioleta en medio alcohólico utilizando como solvente Etanol de 96%.

### **PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO**

Procedimiento:

1.-Preparación de la disolución de Nifedipino patrón de referencia: Se pesaron 25,2 mg de nifedipino sustancia de referencia y se transfirió a un frasco volumétrico de 50 mL. Se adicionó 30 mL de etanol 96 % y se agitó hasta total

disolución. Se enrasó con el mismo solvente, se pipetearon 3 mL de la solución, se transfirieron a un frasco volumétrico de 50 mL y se enrasó con etanol al 96 %. Se obtuvo una solución con una concentración de 30 µg/mL. Se determinó la absorbancia a 342 nm.

2.-Preparación de la disolución muestra de Nifedipino: Se pesó 20 tabletas de nifedipino, se determinó el peso promedio y se trituraron en un mortero. Se pesó polvo de tabletas equivalente a 15 mg de nifedipino, se transfirió a un frasco volumétrico de 50 mL y se le adicionó 30 mL de etanol al 96 %, lo cual se agitó mecánicamente durante 30 min. Se enrasó con etanol al 96 % y se filtró, y se desecharon los primeros 15 mL del filtrado. Se pipetearon 5 mL del filtrado y se transfirieron a un frasco volumétrico de 50 mL. Se enrasó con etanol al 96 %. Se obtuvo una solución con una concentración de 30 µg/mL. Se determinó la absorbancia a 342 nm. Una vez determinada la absorbancia de la muestra y el patrón de referencia, se calculó el porcentaje de principio activo.

#### 6.1.5 Cálculos:

$$[MP] = \frac{\text{AbsMP} \times [ST] \times \text{PostStTC} \times \text{Fd (MP)} \times \text{PP}}{\text{AbsST} \times \text{mg/tab}}$$

Dónde:

[MP] : Concentración en miligramos de Nifedipino por tableta

AbsMP : Absorbancia de la muestra problema

[ST] : Concentración del estándar

AbsST : Absorbancia del estándar

Post St TC: Potencia del estándar tal cual

Fd(MP) : Factor de dilución de la muestra problema.

PP : Peso promedio de las tabletas.

## 7.- DESARROLLO DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

**7.1 LINEALIDAD.-** Se determina empleando estándares de referencia en las concentraciones de 50, 70, 100, 125 y 150%; siendo el 100% una concentración final de 30 µg/mL, que corresponde a la concentración final de la muestra en el ensayo.

Leer a una longitud de onda de 342 nm, y usar como blanco Etanol 96%. Se construyeron curvas de absorbancia contra concentración y se efectuó un análisis de regresión, calculando el coeficiente de regresión (r), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), coeficiente de variación de los factores de respuesta ( $CV_f$ ), las pendientes, interceptos y significación de estas.

**Los criterios de aceptación son:**

$CV_f \leq 5 \%$ ;  $r \geq 0,99$ ;  $r^2 \geq 0,98$ ; intercepto no significativamente diferente de cero y la pendiente altamente significativa.

**PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES:**

a.-Solución Madre (concentración = 30µg/mL)

Pesar 30mg de Nifedipino estándar colocar en una Fiola de 100mL y enrasar con Etanol 96% y homogenizar.

a.1 Solución Estándar al 50% (Concentración = 15 µg/mL)

En una Fiola de 100 mL, colocar 5 mL de la solución Madre exactamente medidos, enrasa con Etanol 96% y homogenizar.

a.2 Solución estándar al 70% (Concentración = 21 µg/mL)

En una Fiola de 100 mL, colocar 7 mL de la solución Madre exactamente medidos, enrasar y homogenizar.

a.3 Solución estándar al 100%( Concentración = 30 µg/mL)

En una Fiola de 100 mL, colocar 10 mL de la solución Madre exactamente medidos, enrasa con Etanol 96% y homogenizar.

a.4 Solución estándar al 125% (Concentración= 37,5 µg/mL)

En una Fiola de 100 mL, colocar 12,5 mL de la solución Madre exactamente medidos, enrasar y homogenizar.

a.5 Solución estándar al 150% (Concentración =45 µg/mL)

En una Fiola de 100 mL, colocar 15 mL de la solución Madre exactamente medidos, enrasar y homogenizar.

**7.2 EXACTITUD.-** Se construyeron las curvas de calibración (3 puntos por triplicado de 50, 100 y 150 % y se calculó el % de recuperación (% recuperado vs. % teórico de los puntos equivalentes al 50, 100 y 150 %). Los resultados fueron procesados estadísticamente de igual forma que la curva de calibración de la linealidad del sistema.

**Los criterios de aceptación son:**

% R = 97-103 %; CV  $\leq$  3,0 %.

**7.3 PRECISIÓN.** -Dentro del término de precisión se pueden distinguir dos estudios Repetibilidad y Precisión intermedia.

**-Repetibilidad:** este ensayo se realizó con disoluciones muestras de nifedipino con concentraciones de 21; 30 y 34,5  $\mu\text{g/mL}$  correspondientes al 70, 100 y 115 % de la concentración de trabajo, por el mismo analista, en el mismo laboratorio, el mismo día y con el mismo equipo y reactivos, realizando cada nivel por triplicado.

**Criterios de aceptación:**

Los coeficientes de variación de los porcentajes de contenido para cada nivel de concentración deben ser menores o iguales al 1,5 %.

**PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES:**

a.-Solución Madre (concentración = 30 $\mu\text{g/mL}$ )

Pesar 30mg de Nifedipino estándar colocar en una Fiola de 100mL y enrasar con Etanol 96% y homogenizar.

a.1 Solución estándar al 70% (Concentración = 21  $\mu\text{g/mL}$ )

En una Fiola de 100 mL, colocar 7 mL de la solución Madre exactamente medidos, enrasar y homogenizar.

a.2 Solución estándar al 100%( Concentración = 30  $\mu\text{g/mL}$ )

En una Fiola de 100 mL, colocar 10 mL de la solución Madre exactamente medidos, enrasa con Etanol 96% y homogenizar.

a.5 Solución estándar al 115% (Concentración = 34,5  $\mu\text{g/mL}$ )

En una Fiola de 100 mL, colocar 11,5 mL de la solución Madre exactamente medidos, enrasar y homogenizar.

**-Precisión intermedia:** este ensayo se realizó con disoluciones muestras de nifedipino con concentraciones de 30 µg/mL correspondientes al 100 % de la concentración de trabajo, por triplicado, por 2 analistas, durante 3 días sin variar las condiciones experimentales.

**Criterios de aceptación:**

El coeficiente de variación debe ser menor o igual al 3,0 %.

**ROBUSTEZ:** en este ensayo se trabajó con una disolución de nifedipino de concentración de 30 µg/mL correspondientes al 100%; una diluida en alcohol de 96% y la otra diluida con metanol y se determinó la absorbancia a longitudes de onda de lectura de  $342 \pm 3$ .

#### 2.4.2 Instrumentos

Balanza

Mortero y pilón

Embudo y papel filtro

Espectrofotómetro y hoja de registro de datos.

## CAPÍTULO IV

### PRESENTACIÓN, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

#### 4.1 Resultados

En la Tabla N° 4 se muestra el peso de las 20 tabletas de Nifedipino, dando como resultado un valor de 232,14mg/tableta, con un peso mínimo de 227,1 mg y máximo de 239,3 mg, una DS de 3,0%; con una precisión expresada como CV% de 1.3%, por lo que el resultado cumple con lo especificado en el protocolo de análisis.

**TABLA N° 4: Peso promedio del contenido de Nifedipino**

| N° Tableta    | Peso ( mg ) |
|---------------|-------------|
| Tableta N° 1  | 233,7       |
| Tableta N° 2  | 232,7       |
| Tableta N° 3  | 233,2       |
| Tableta N° 4  | 232,8       |
| Tableta N° 5  | 239,3       |
| Tableta N° 6  | 232,7       |
| Tableta N° 7  | 236,2       |
| Tableta N° 8  | 232,3       |
| Tableta N° 9  | 230,5       |
| Tableta N° 10 | 233,7       |
| Tableta N° 11 | 231,6       |
| Tableta N° 12 | 233,4       |
| Tableta N° 13 | 229,7       |
| Tableta N° 14 | 230,0       |
| Tableta N° 15 | 227,2       |
| Tableta N° 16 | 227,7       |
| Tableta N° 17 | 235,1       |
| Tableta N° 18 | 230,6       |

|                 |        |
|-----------------|--------|
| Tableta N° 19   | 227,1  |
| Tableta N° 20   | 233,3  |
| <b>Promedio</b> | 232,14 |
| <b>DS</b>       | 3,0    |
| <b>CV%</b>      | 1,3    |
| <b>Mínimo</b>   | 227,1  |
| <b>Máximo</b>   | 239,3  |

Fuente y Elaboración propia.

En la Tabla N° 5 se muestra los resultados de absorbancia obtenidos de las Muestras N° 1, 2 y Estándar preparados según esquema experimental y se hizo la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 342 nm.

**TABLA N° 5: Lectura de la muestra de Nifedipino**

| <b>MUESTRA</b>     | <b>ABSORBANCIA</b> |
|--------------------|--------------------|
| M 1                | 0.3352             |
|                    | 0.3324             |
| <b>Promedio M1</b> | <b>0.3347</b>      |
| M 2                | 0.3365             |
|                    | 0.3350             |
| <b>Promedio M2</b> | <b>0.3357</b>      |
| ST                 | 0.2947             |
|                    | 0.2945             |
|                    | 0.2951             |
|                    | 0.2946             |
|                    | 0.2949             |
| <b>Promedio St</b> | <b>0.2948</b>      |

Fuente y Elaboración propia

En la tabla N° 6 se muestra los resultados de cuantificación de principio activo contenido en la tableta de Nifedipino de 10mg, donde se observa un valor de 10,94 mg/tab correspondiente al 109,4%, de la cantidad rotulada el cual cumple con la especificación establecida (90 – 110%)

**TABLA N° 6: Cuantificación de Nifedipino en tabletas del Laboratorio**

| Muestra         | Concentración<br>mg / tab | % Nifedipino |
|-----------------|---------------------------|--------------|
| <b>M1</b>       | 10.93                     | 109.3        |
| <b>M2</b>       | 10.96                     | 109.6        |
| <b>PROMEDIO</b> | <b>10,94</b>              | <b>109,4</b> |

Fuente y Elaboración propia

#### Resultados de Validación del Método Analítico

En la Tabla N° 7 se observan los resultados mostrando valores de coeficiente de correlación  $r$  igual a 0,9992, coeficiente de determinación de 0,9983 y coeficientes de variación de los factores de respuesta de 0,7%. El análisis estadístico de regresión ofreció un intercepto que no es estadísticamente diferente de cero: -0.0428. La pendiente resultó ser altamente significativa: 0,0085.

**TABLA N° 7: Prueba de Linealidad**

| Conc (%) | C(x) µg/mL      | Abs           | Factor de respuesta |
|----------|-----------------|---------------|---------------------|
| 50       | 15              | 0,0812        | 0,00541             |
|          |                 | 0,0813        | 0,00542             |
|          |                 | 0,0816        | 0,00544             |
|          | <b>Promedio</b> | <b>0,0814</b> | <b>0,00542</b>      |
|          | 21              | 0,1375        | 0,00655             |
|          |                 | 0,1379        | 0,00657             |

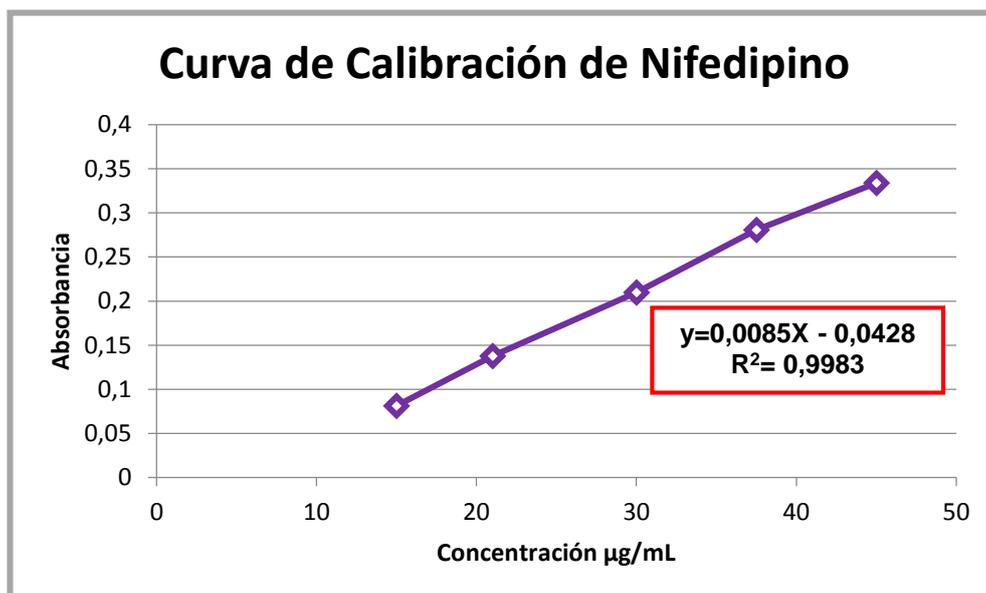
|                                      |                 |               |                |
|--------------------------------------|-----------------|---------------|----------------|
| 75                                   |                 | 0,1377        | 0.00656        |
|                                      | <b>Promedio</b> | <b>0,1377</b> | <b>0,00656</b> |
| 100                                  | 30              | 0,2098        | 0,00699        |
|                                      |                 | 0,2102        | 0,00701        |
|                                      |                 | 0,2097        | 0,00699        |
|                                      | <b>Promedio</b> | <b>0,2099</b> | <b>0,00700</b> |
| 125                                  | 37,5            | 0,2813        | 0,00750        |
|                                      |                 | 0,2807        | 0,00748        |
|                                      |                 | 0,2803        | 0,00747        |
|                                      | <b>Promedio</b> | <b>0,2807</b> | <b>0,00748</b> |
| 150                                  | 45              | 0,3339        | 0,00742        |
|                                      |                 | 0,3342        | 0,00743        |
|                                      |                 | 0,3340        | 0,00742        |
|                                      | <b>Promedio</b> | <b>0,3341</b> | <b>0,00742</b> |
| <b>Promedio Total</b>                |                 |               | 0,0068         |
| <b>DS</b>                            |                 |               | 17,5           |
| <b>CV%</b>                           |                 |               | 0,7            |
| <b>Coefficiente de correlación</b>   |                 |               | 0,9992         |
| <b>Coefficiente de determinación</b> |                 |               | 0,9983         |
| <b>Intercepto</b>                    |                 |               | -0,0428        |
| <b>Pendiente</b>                     |                 |               | 0,0085         |

Fuente y Elaboración propia.

Ecuación de la recta:

$$y = 0,0085X - 0,0428$$

**GRÁFICO Nº 6: Curva de Calibración de Nifedipino**



Fuente y Elaboración propia.

En la tabla Nº 8 se muestra el porcentaje de recobro de la tableta de Nifedipino donde hay una recuperación cercana al 100%.

**TABLA Nº8: Prueba de Exactitud**

| Concentración % | Absorbancia a 342 nm | Concentración Teórica (µg/mL) | Concentración Obtenida (µg/mL) | % Recuperación |
|-----------------|----------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------|
| 50              | 0.0814               | 15                            | 14,61                          | 97,4           |
| 100             | 0.2099               | 30                            | 29,73                          | 99,1           |
| 150             | 0.3341               | 45                            | 44,34                          | 98,5           |
| <b>Promedio</b> |                      |                               |                                | 98,3           |
| <b>DS</b>       |                      |                               |                                | 0,9            |
| <b>CV %</b>     |                      |                               |                                | 0,9            |

Fuente y Elaboración propia.

En la Tabla Nº 9 se muestra los resultados de coeficiente de variación 0,83%, o sea, menor de 1,5% límite establecido para este método.

**TABLA N°9: Prueba de Repetibilidad**

| <b>Conc (%)</b> | <b>C(x) µg/mL</b> | <b>Abs</b>    |
|-----------------|-------------------|---------------|
| 70              | 21                | 0,1419        |
|                 |                   | 0,1413        |
|                 |                   | 0,1418        |
|                 | <b>PROMEDIO</b>   | <b>0,1417</b> |
| 100             | 30                | 0,2134        |
|                 |                   | 0,2137        |
|                 |                   | 0,2138        |
|                 | <b>PROMEDIO</b>   | <b>0,2136</b> |
| 115             | 34,5              | 0,2541        |
|                 |                   | 0,2534        |
|                 |                   | 0,2544        |
|                 | <b>PROMEDIO</b>   | <b>0,2540</b> |
| <b>DS</b>       |                   | 14,2          |
| <b>CV%</b>      |                   | 0,83          |

Fuente y Elaboración propia.

En la Tabla N° 10 se muestra el resultado del coeficiente de variación igual a 0,12; y fue menor al límite superior establecido para el método ( $CV \leq 3\%$ ).

**TABLA N° 10: Prueba de Precisión Intermedia**

| <b>DÍAS</b> | <b>N° de Replicas</b> | <b>Analista I</b> | <b>Analista II</b> |
|-------------|-----------------------|-------------------|--------------------|
| I           | 1                     | 0,2146            | 0,2149             |
|             | 2                     | 0,2144            | 0,2154             |
|             | 3                     | 0,2147            | 0,2146             |
|             | <b>PROMEDIO</b>       | 0,2146            | 0,2150             |
| II          | 1                     | 0,2145            | 0,2152             |
|             | 2                     | 0,2148            | 0,2150             |
|             | 3                     | 0,2145            | 0,2146             |
|             | <b>PROMEDIO</b>       | 0,2146            | 0,2149             |
| III         | 1                     | 0,2150            | 0,2148             |
|             | 2                     | 0,2150            | 0,2158             |
|             | 3                     | 0,2156            | 0,2146             |
|             | <b>PROMEDIO</b>       | 0,2152            | 0,2151             |
| <b>DS</b>   |                       |                   | 0,00033            |
| <b>CV%</b>  |                       |                   | 0,12               |

Fuente y Elaboración propia

En la Tabla N° 11 se muestra el resultado del coeficiente de variación igual a 0,8; y fue menor al límite superior establecido para el método ( $CV \leq 2\%$ ).

**tabla n° 11: Prueba de Robustez**

| <b>Solvente</b> | <b>N° de Replicas</b> | <b>Abs a 339nm</b> | <b>Abs a 342nm</b> | <b>Abs a 345nm</b> |
|-----------------|-----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| ETANOL          | 1                     | 0,4237             | 0,4291             | 0,4228             |
|                 | 2                     | 0,4235             | 0,4293             | 0,4227             |
|                 | 3                     | 0,4234             | 0,4286             | 0,4229             |
|                 | <b>PROMEDIO</b>       | 0,4235             | 0,4290             | 0,4228             |
| METANOL         | 1                     | 0,3415             | 0,3453             | 0,3404             |
|                 | 2                     | 0,3413             | 0,3450             | 0,3399             |
|                 | 3                     | 0,3414             | 0,3449             | 0,3399             |
|                 | <b>PROMEDIO</b>       | 0,3414             | 0,3451             | 0,3401             |
| <b>DS</b>       |                       |                    | 0,0034             | 0,0026             |
| <b>CV%</b>      |                       |                    | 0,80               | 0.76               |

Fuente y Elaboración propia.

#### **4.2 Análisis e Interpretación de Resultados**

Para la validación del método analítico por Espectrofotometría UV-VIS se analizaron los parámetros siguientes parámetros:

Linealidad como se observa en la Tabla N°7 el valor del coeficiente de correlación  $r=0,9992$  por lo que se acerca a la unidad y coeficiente de determinación  $R^2=0,9983$  siendo el valor mínimo permisible de 0,997; así

como también el valor de la pendiente e intercepto están dentro de los límites exigidos: por lo que queda demostrado que hay una buena correlación entre la concentración y la respuesta obtenida (valores de absorbancia) por lo tanto el método es lineal ya que cumple con las especificaciones exigidas.

Exactitud cómo se observa en la Tabla N° 8 los resultados están en función del porcentaje de recuperación y el coeficiente de variación, así queda demostrado que el método es exacto ya que los valores de porcentaje de recuperación son cercanos al 100% (%R=98,3%).

Repetibilidad como se observa en la Tabla N° 9 en los resultados se analizaron los niveles de concentración equivalentes al 70, 100 y 115 % de la concentración de trabajo. Se considera bajo el 70 % ya que el límite de aptitud del producto terminado es entre 90 y 110 % de la cantidad establecida. El valor de 115 % se considera alto pues constituye el límite superior establecido para la uniformidad de contenido. Cuando se compararon las dispersiones para los 3 niveles de concentraciones estudiadas, se demostró la no existencia de diferencias estadísticamente significativas. El valor total de CV fue menor del 1,5 % (CV=0,83%), límite establecido para este método. Estos resultados nos permiten afirmar que el método es repetible en los 3 niveles de concentración estudiados, por cumplir los parámetros establecidos como límite de aceptación.

Precisión Intermedia como se observa en la tabla N° 10 los resultados indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones estándares de los resultados obtenidos en los 3 días ensayados y por los 2 analistas. Se obtuvo un valor de CV menor del límite establecido para este método que es  $CV \leq 3$ , lo que demuestra que los resultados son independientes del día en que se haga el análisis y de la habilidad del analista que lo ejecute.

Robustez como se observa en la Tabla N°11 los resultados obtenidos demuestran la no existencia de diferencias estadísticamente significativas

para cada uno de los parámetros estudiados. Esto permite afirmar que el método es robusto en las condiciones de estudio.

La cuantificación de nifedipino como se observa en la Tabla N° 6 el contenido de principio activo nos dio un valor de 10,94 mg/tableta equivalente al 109,4 %, podemos afirmar que se encuentra dentro del límite permisible (90 – 110%), y por lo tanto se cumplió con las especificaciones de calidad de la tableta.

## DISCUSIÓN

En el estudio de Morales De La Cruz C. “Desarrollo y Validación Prospectiva de una Técnica Analítica Por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) para Enalapril 10mg Tabletas Cubiertas”, Perú-2004 donde el método analítico propuesto fue “selectivo porque se evidenciaron que los productos de degradación no interfirieron en el análisis del principio activo, fue lineal porque se obtuvo un coeficiente de correlación  $r=0,99987$ , preciso ya que para la repetibilidad se obtuvo una RSD de 0.64% y reproducible con una RSD de 0,88% y además exacto porque se obtuvo un porcentaje de recuperación de 99,88%; a pesar que HPLC es la técnica Gold estándar para validación de métodos, en nuestro estudio al analizar los resultados cumplen con los parámetros exigidos y se afirma que el método es lineal porque se pudo demostrar que el valor de  $r$  se acercó bastante a la unidad (0,9992), CVf (0,7%), exacto porque se obtuvo un porcentaje de recuperación de 98,3%, preciso ya que para la repetibilidad se obtuvo CV 0,83%.

En el estudio realizado por Silva Campos, N. “Validación de un método analítico por espectrofotometría visible para la cuantificación de Memantina clorhidrato 5 mg en tabletas recubiertas”, Perú-2014 donde la exactitud (99,8%) y la especificidad demostraron que los excipientes no interfieren en la cuantificación de Memantina HCl en tabletas recubiertas de 5 mg, obteniendo un porcentaje de recuperación cercano al 100%; siendo esta técnica de elección para el análisis de identificación y el contenido de principios activos de medicamentos así mismo el valor obtenido para el parámetro de exactitud fue 98,3%, cercano al 100%, que se demuestra la cercanía entre el valor real y el obtenido, a pesar que fueron las mismas técnicas se observan que los resultados varían pero en mínima cantidad debido a las condiciones de trabajo.

En un estudio realizado por Cárdenas Castañeda D. “Validación de un método UV-VIS para la cuantificación de fenoles totales en Jarabe

Vimang” Cuba, se demostró la proporcionalidad y linealidad en el intervalo estudiado, con  $r = 0,997$ , los CV obtenidos en los estudios de repetibilidad y reproducibilidad estuvieron por debajo del límite máximo establecido (1,5 y 2% respectivamente), y selectivo porque mediante la comparación de los espectros del jarabe recién preparado, degradado y placebo no se evidenció que los productos de degradación interfirieron en el análisis, con respecto a nuestro estudio en el parámetro de precisión, medidos tanto como repetibilidad y precisión intermedia se obtuvo un coeficiente de variación 0,83% y 0,12% respectivamente, siendo el límite máximo permisible 1,5% y 3%, por lo que el método resulto preciso ya que se encuentre dentro de los rangos de aceptación propuesto por la reglamentaciones internacionales, se utilizaron la mismas técnica y se pudo demostrar que en ambos casos la Espectrofotometría Ultravioleta visible en un método seguro y confiable a pesar que fueron distintas formas farmacéuticas.

En un estudio de Mora C., Tello M. y Martínez F. “Validación de una metodología analítica para la cuantificación de Naproxeno en estudios de reparto líquido/líquido mediante espectrofotometría ultravioleta”, Colombia-2006, se demostró que fue lineal obteniendo un  $r=0,9996$  y CVF= 1,6%, exacto porque el % de recuperación fue 98.75% y preciso ya que para repetibilidad se obtuvo un CV de 1,02%, en comparación a nuestro estudio en el caso de linealidad se obtuvo valores de  $r =0,9992$  cercano a la unidad, CV% 0.7%, siendo el criterio de aceptación  $CV \leq 5\%$ , por lo que resultó satisfactoria ya que cumple con los rangos establecidos según USP 39, analizando los resultados se evidencia que ambos estudios cumplen con las especificaciones establecidas y que la Espectrofotometría Ultravioleta visible no garantiza resultados íntegros, seguros y confiables.

## CONCLUSIONES

Se desarrolló un esquema para la validación verificándose el cumplimiento de los parámetros de aceptabilidad y se comprobó la metodología para validar la técnica según la USP 39, que ayudara para futuras validaciones.

Se ha demostrado la validez de la metodología y se ha verificado los parámetros de aceptabilidad para validar la técnica en función de los criterios de la USP 39, y se ha establecido un protocolo de validación por Espectrofotometría Ultravioleta visible.

El método de validación de Nifedipino de 10mg propuesto, cumple con las exigencias dadas por la USP 39 en todos los parámetros de validación. Produce resultados proporcionales a la concentración del analito en la muestra, por lo tanto el método es lineal; es preciso porque nos permite obtener resultados repetitivos y reproducibles; es exacto porque permite la recuperación de la totalidad del analito presente en las muestras y es robusto porque permanece inafectado frente a variaciones.

Se comprobó que el método analítico utilizado para la cuantificación de Nifedipino tabletas de 10 mg es seguro y confiable, ya que los resultados obtenidos cumplen con los criterios de aceptación establecidos como coeficiente de correlación cercano a la unidad (0,9%), porcentaje de recuperación de 98,3% siendo el límite permisible de 98-103%;

## **RECOMENDACIONES**

Se recomienda la validación de métodos por Espectrofotometría Ultravioleta visible, ya que es un método sencillo, rápido y económico.

Se debe considerar la validación de métodos analíticos a ser aplicados en las labores de análisis; así estos estén contemplados en las farmacopeas oficiales, ya que las condiciones analíticas no son las mismas que aquellas con las que fueron desarrolladas, además de ser una disposición de la autoridad sanitaria DIGEMID.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Amezcuita F. Fundamentos de la Espectroscopia Aplicada a la Instrumentación Química. DCNE, 4ª Edición. México, D.F.; 2008.
- 2.- Castineira, Mirta. Desarrollo de un método y su validación para la determinación de melatonina en tabletas. ©Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales. Superficies y Vacío 22(3) 29-32; 2009.
- 3.- NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.
- 4.- Morales De La Cruz C. Desarrollo y Validación Prospectiva de una Técnica Analítica Por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) para Enalapril 10mg Tabletadas Cubiertas. (Tesis doctoral). Lima: Servicio de Publicaciones Cybertesis, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2004.
- 5.- Silva Campos, N. Validación de un método analítico por espectrofotometría visible para la cuantificación de Memantina clorhidrato 5 mg en tabletas recubiertas. (Tesis doctoral). Lima: Servicio de Publicaciones Cybertesis, Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2004.
- 6.- Cárdenas Castañeda D. Validación de un método UV-VIS para la cuantificación de fenoles totales en Jarabe Vimang. (Tesis doctoral). Cuba: Servicio de Publicaciones Cybertesis, Universidad de Habana; 2006
- 7.- Mora C., Tello M. y Martínez F. Validación de una metodología analítica para la cuantificación de Naproxeno en estudios de reparto líquido/líquido mediante espectrofotometría ultravioleta. Rev. Col. Cienc. Quím. Farm. 2006 Vol. 35 (1), 81-105

- 8.- USP 31 –NF 26, Capítulo General Validación de métodos farmacopéicos, 2008.
- 9.-Morkowski J. Characterisation and Validation of Test Methods, artículo presentado en el EUROLAB Symposium, Berlin, 5-7 de junio de 1996. P.70-82.
- 10.- Aguirre L, et al. Validación de métodos analíticos, Asociación Española de Farmacéuticos de Industria, Barcelona, 2001, parte II.
11. - FDA: Registro Federal; Validation of Analytical Procedures, Vol 60, 1995, p. 11260-11262
- 12.- Guidelines for Collaborative Study - Procedures to Validate Characteristics of a Method of analysis, AOAC International, revised May 1994, publicado originalmente en J. Assoc. Off. Anal. Chem. 72, p. 694-704
- 13.- Castro M, Gaston S, Pujol M. Validación de métodos analíticos. A.E.F.I. Sección catalana; Madrid, 1998.
- 14.- CECMED, Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos. Regulación 5 Principios generales para la validación de los procesos en la industria farmacéutica, 1994.
- 15.- Flores Jaime J. Validación concurrente del proceso de fabricación de tabletas recubiertas de amoxicilina 500mg (Tesis doctoral). Lima: Servicio de Publicaciones Cybertesis, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2002.
- 16.- Caro C.F. Validación de procesos no estériles (I) Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, Madrid; 1996. pág. 59-65.
- 17.- CECMED Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos. Regulación 16. Directrices sobre Buenas Prácticas de Fabricación de Productos Farmacéuticos, 2006.

18. - GUIDELINE ON GENERAL PRINCIPLES OF PROCESS VALIDATION, FDA, MAY 1987 <http://www.fda.gov/cder/guidance/pv.htm>

19.- Caro C. Validación de procesos no estériles, Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, Madrid; 1996, p. 67-68.

20.- Soberon E; García M; Cortés M; Rodríguez R; Herrera J; Alcántara A. Guía de validación de Métodos Analíticos. México: Colegio Nacional de Químicos y Farmacéuticos Biólogos, 2002. p. 8-11, 20-21, 23-24, 30-32, 34-38, 38, 40

21.- Díaz A. Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas (Córdoba, Argentina). 2005; 8:1-7. Disponible en: <http://www.slideshare.net/asaor/espectrofotometria-presentation>

22.- Owen T. Fundamentos de la Espectroscopía UV-visible Moderna. Alemania 1988.

23.-Fisher, J.; Mack, R; Borer, J. S.; Pickering, T.; Niarchos, A.; "Nifedipine in pulmonary hypertension: Importance of Raynaud "s phenomenon" Clinical Research.1983.p. 696.

24.- Ficha de Datos de Seguridad ACOFARMA Conforme al Reglamento (CE) Nº 1907/2006 (REACH). Disponible en <http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/1873cc196c14b26c21531a103e3b5519ac8ff1510ef2/main/files/Nifedipino.pdf>

25.-Pedregal, C.; Avendaño, C.; "Fármacos que alteran el transporte a través de las membranas celulares." En: Avendaño, C., Introducción a la Química farmacéutica. McGraw-Hill-Interamericana de España, 1993.p. 337-369.`

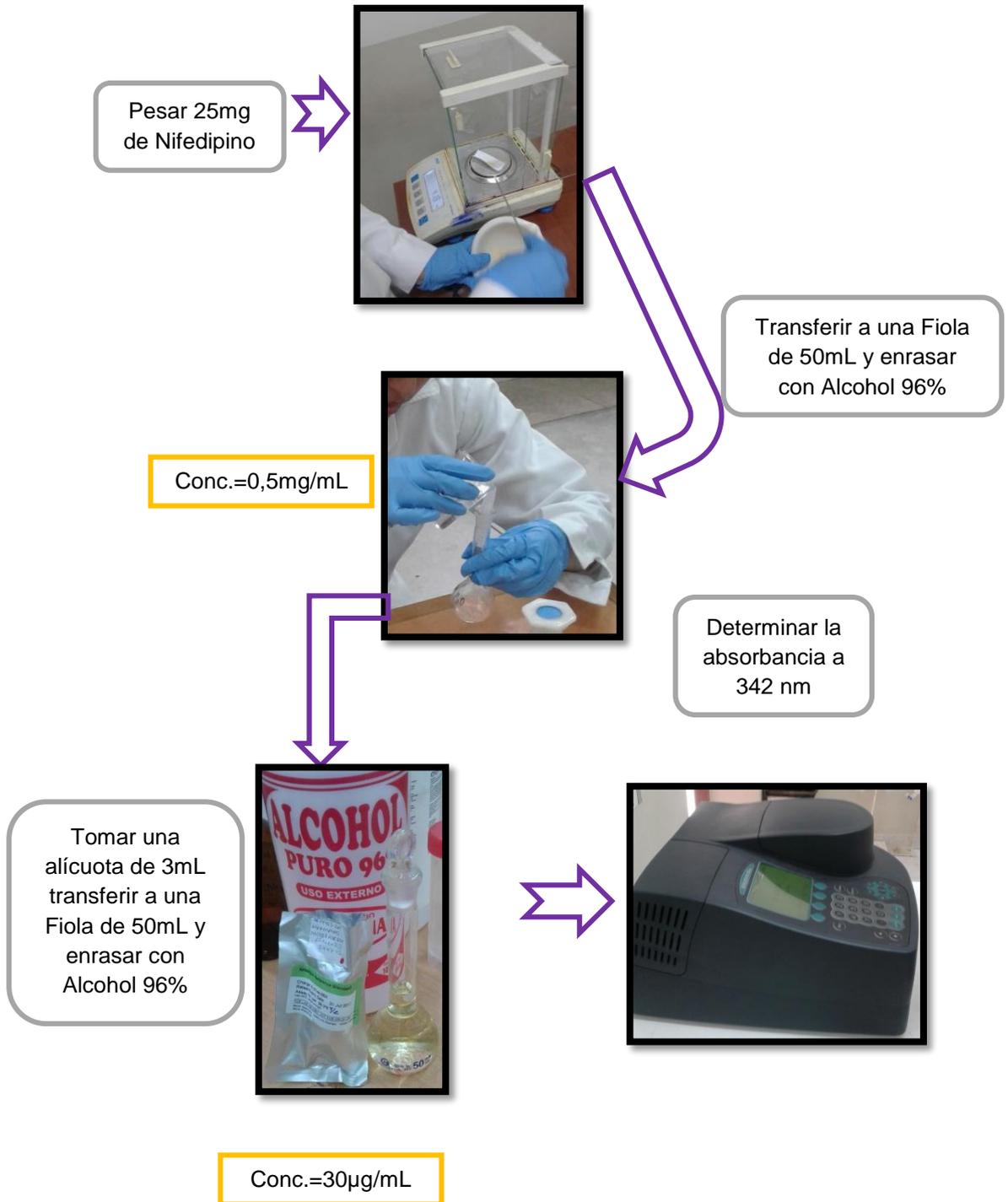
26.- United States Pharmacopoeia Convention. Farmacopea de los Estados Unidos USP 39. Validation of Compendial Methods. 27 ed. Rockville: Maryland; 2004

## **ANEXOS**



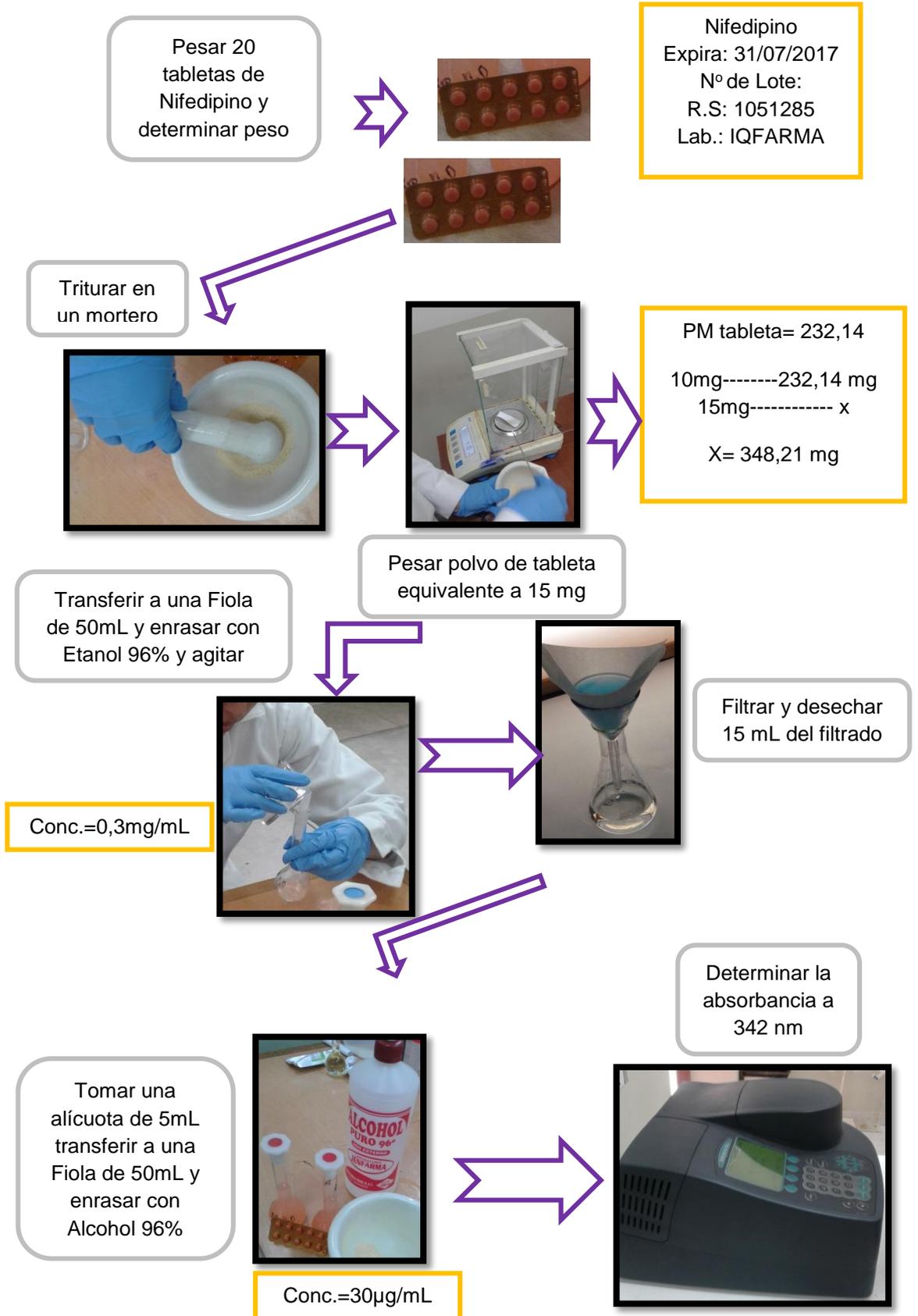
## ANEXO Nº 2

### Preparación de la disolución de Nifedipino patrón de referencia



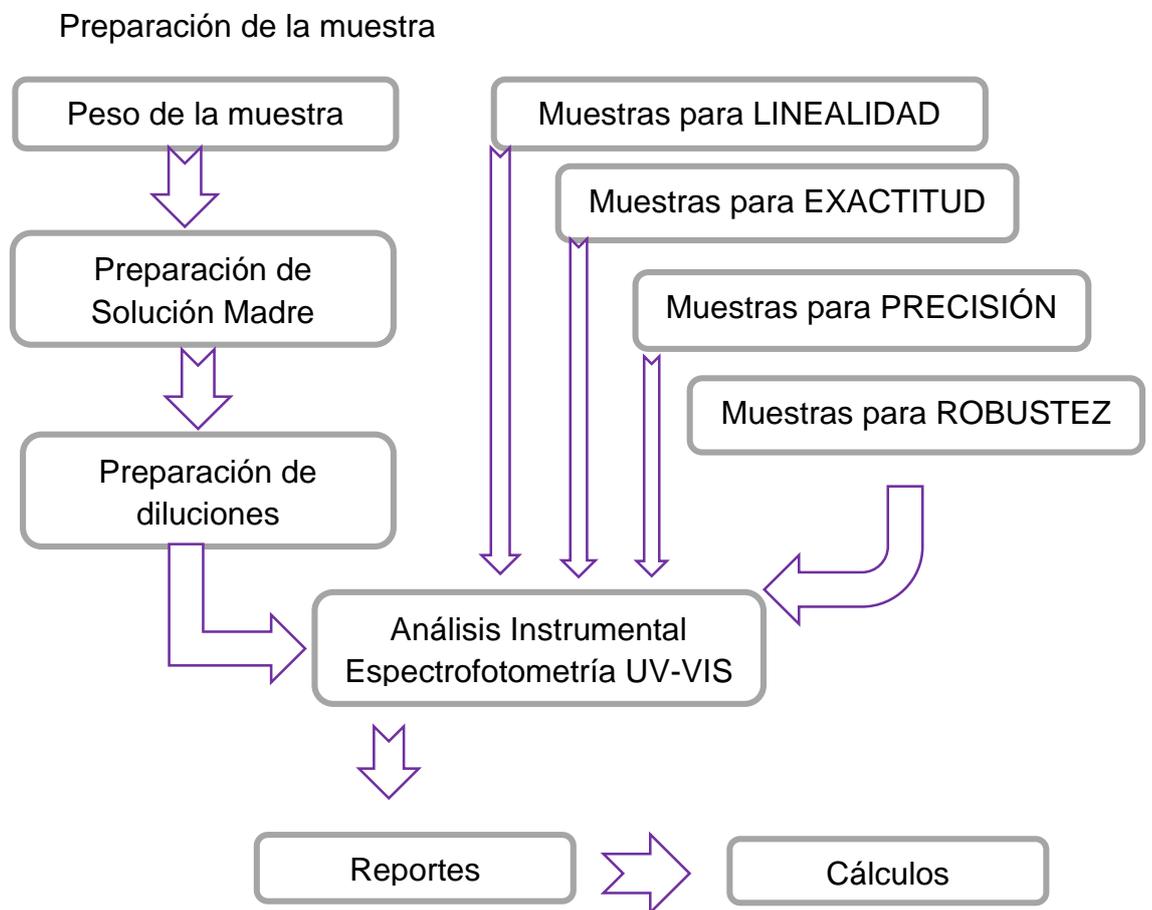
### ANEXO Nº 3

#### Preparación de la disolución muestra de Nifedipino



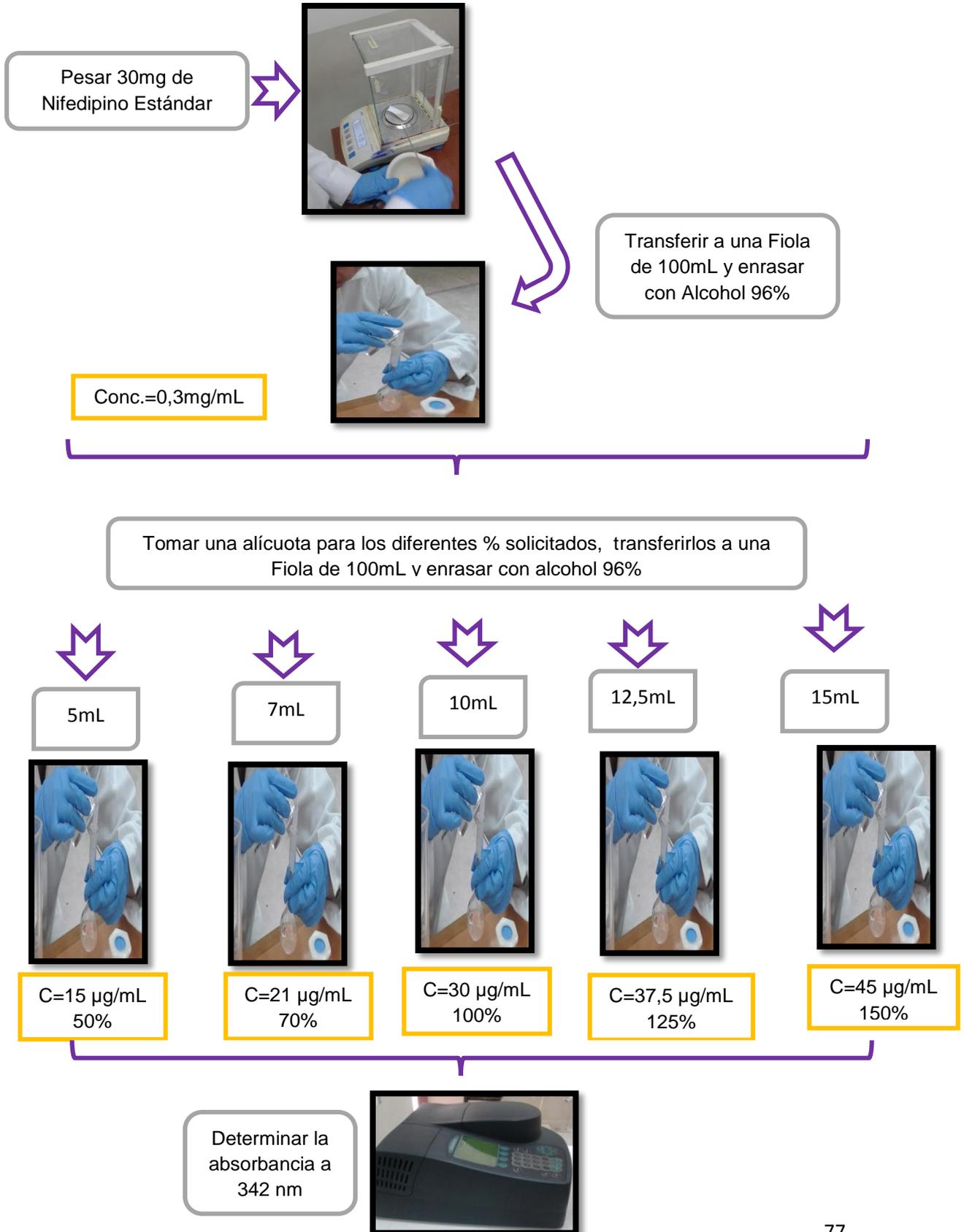
## ANEXO Nº 4

Diagrama de flujo del proceso analítico de Nifedipino de 10mg tableta



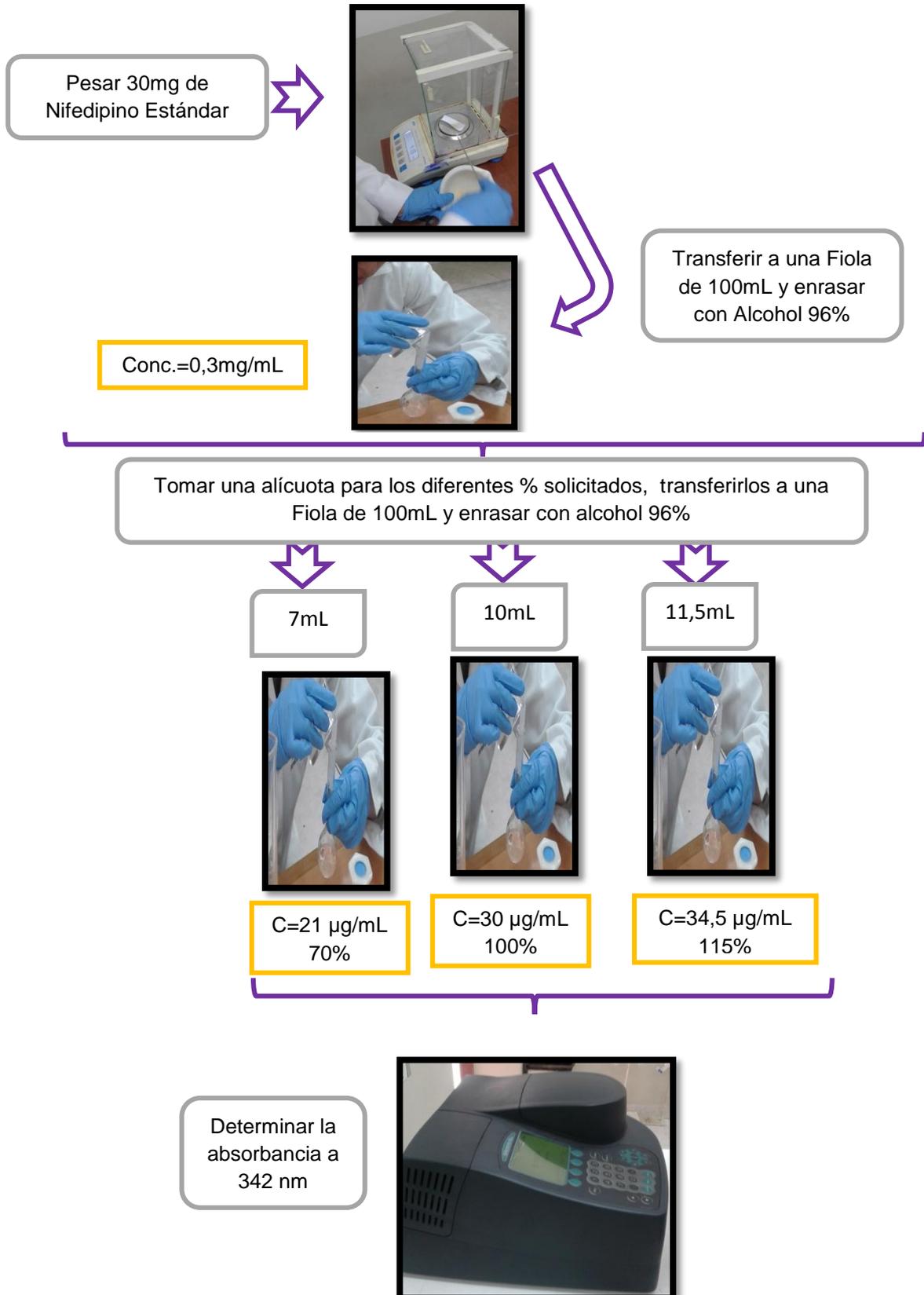
## ANEXO Nº 5

### Esquema de dilución para Linealidad



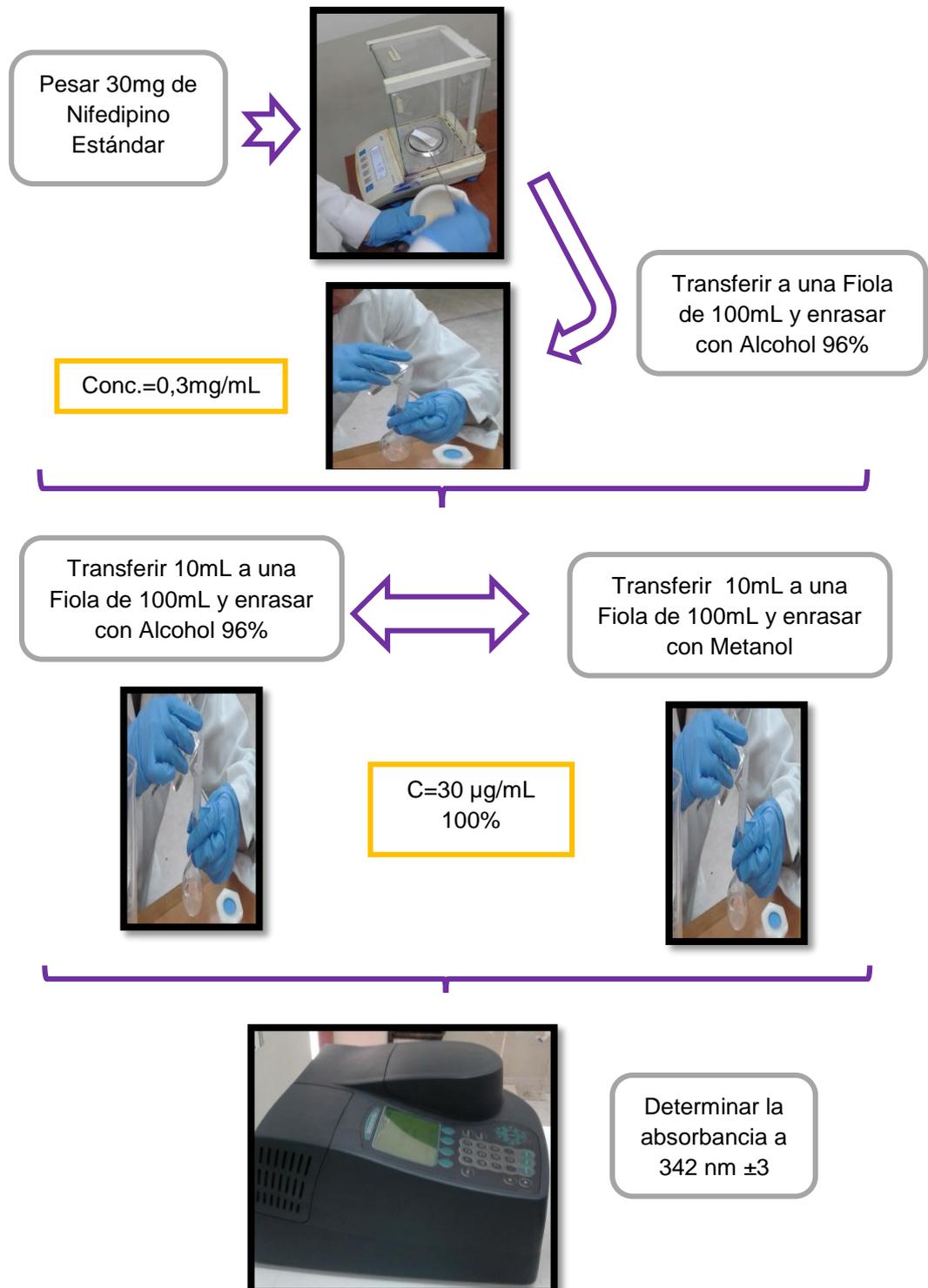
## ANEXO N° 6

### Esquema de dilución para Repetibilidad



## ANEXO Nº 7

### Esquema de dilución para Robustez



**ANEXO Nº 8**  
**INFORME TÉCNICO**

PRODUCTO: NIFEDIPINO de 10 mg TABLETAS

METODO : ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA VISIBLE

| PARÁMETRO                                 | LÍMITE           | RESULTADOS  |
|---|------------------|---|
| <b>1.-LINEALIDAD</b>                      |                  |   |
| Ecuación de la Recta                      | $Y = bx + a$     | $Y = 0,0085x - 0,0428$  |
| Coefficiente de correlación               | $r \geq 0,99$    | $r = 0,9992$  |
| Coefficiente de determinación             | $r^2 \geq 0,98$  | $r^2 = 0,9983$  |
| Coefficiente de variación de la respuesta | $CV_f \leq 5 \%$ | $CV = 0,7\%$  |
| <b>2.- EXACTITUD</b>                      |                  |   |
| Porcentaje de recuperación                | 97 – 103%        | 98,3%   |
| Coefficiente de variación                 | $CV \leq 3 \%$   | $CV = 1,3\%$  |
| <b>3.- PRECISIÓN</b>                      |                  |   |
| Repetibilidad                             |                  |   |
| Método Espectrofotométrico                | $CV \leq 1,5\%$  | $CV = 0,83\%$   |
| Precisión Intermedia                      |                  |   |
| Método Espectrofotométrico                | $CV \leq 3\%$    | $CV = 0,12\%$   |
| <b>4.- ROBUSTEZ</b>                       |                  |   |
| Coefficiente de variación                 | $CV \leq 2\%$    | $CV_{\text{etanol}} = 0,80\%$<br><br>$CV_{\text{metanol}} = 0,76\%$ |

**Fuente y Elaboración:** propia.

## ANEXO N° 9

### USP 39

USP 39

Monografías Oficiales / Nifedipino 5541

#### • VALORACIÓN VOLUMÉTRICA CON ÁCIDO PERCLÓRICO

**Solución muestra:** Disolver 4 g de Nifedipino en 160 mL de ácido acético glacial en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con ayuda de un baño ultrasónico.

**Sistema volumétrico**

**Modo:** Valoración directa

**Solución volumétrica:** Ácido perclórico 0,1 N SV

**Punto final:** Visual

**Análisis:** Agregar 3 gotas de *p*-naftolbencéina SR a la *Solución muestra* y valorar con *Solución volumétrica* hasta un punto final verde.

**Criterios de aceptación:** Se consumen no más de 0,12 mL de ácido perclórico 0,1 N por cada g de Nifedipino.

#### PRUEBAS ESPECÍFICAS

##### • PERDIDA POR SECADO (731)

**Análisis:** Secar una muestra a 105° hasta peso constante.

**Criterios de aceptación:** No más de 0,5%

#### REQUISITOS ADICIONALES

• **ENVASADO Y ALMACENAMIENTO:** Conservar en envases impermeables y resistentes a la luz.

##### • ESTÁNDARES DE REFERENCIA USP (11)

ER Nifedipino USP

ER Análogo Nitrofenilpiridínico de Nifedipino USP

4-(2-Nitrofenil)-2,6-dimetilpiridina-3,5-dicarboxilato de dimetilo.

$C_{17}H_{16}N_2O_6$  344,33

ER Análogo Nitrosufenilpiridínico de Nifedipino USP

4-(2-Nitrosufenil)-2,6-dimetilpiridina-3,5-dicarboxilato de dimetilo.

$C_{17}H_{16}N_2O_5$  328,33

## Nifedipino, Cápsulas

#### DEFINICIÓN

Las Cápsulas de Nifedipino contienen no menos de 90,0% y no más de 110,0% de la cantidad declarada de nifedipino ( $C_{17}H_{16}N_2O_6$ ).

Cuando el Nifedipino se expone a la luz del día y a ciertas longitudes de onda de luz artificial, se convierte fácilmente en un derivado nitrosufenilpiridínico. La exposición a luz UV lleva a la formación de un derivado nitrofenilpiridínico. Realizar las valoraciones y pruebas en la oscuridad o bajo luz fluorescente dorada u otra luz con protección actínica. Usar material de vidrio con protección actínica.

#### IDENTIFICACIÓN

##### • A.

**Solución estándar:** 1,2 mg/mL de ER Nifedipino USP en cloruro de metileno

**Solución muestra:** Usando la técnica descrita en la prueba de *Uniformidad de Unidades de Dosificación*, en *Procedimiento para uniformidad de contenido*, transferir el contenido de 3 Cápsulas a un tubo de centrifuga, enjuagando las tijeras con 20 mL de hidróxido de sodio 0,1 N. Pipetear y transferir 25 mL de cloruro de metileno al tubo, tapar, invertirlo varias veces y liberar cuidadosamente la presión del tubo. Tapar nuevamente con firmeza y agitar suavemente durante 1 hora. Centrifugar el tubo durante 10 minutos a 2000–2500 rpm. Retirar la fase acuosa sobrenadante mediante aspiración con una jeringa y transferir 5,0 mL de la capa inferior clarificada a un vial adecuado.

**Solución mezcla:** Mezcla de *Solución estándar* y *Solución muestra* (1:1)

#### Sistema cromatográfico

(Ver *Cromatografía* (621), *Cromatografía en Capa Delgada*.)

**Adsorbente:** Capa de mezcla de gel de sílice para cromatografía de 0,5 mm

**Volumen de aplicación:** 500  $\mu$ L

**Fase móvil:** Acetato de etilo y ciclohexano (1:1)

**Solución madre de la solución reveladora:** Disolver 3 g de subnitrito de bismuto y 30 g de yoduro de potasio en un matraz volumétrico de 100 mL, en 10 mL de ácido clorhídrico 3 N, y diluir con agua a volumen.

**Solución reveladora:** Antes de usar, mezclar 10 mL de *Solución madre de la solución reveladora* en un matraz volumétrico de 100 mL con 10 mL de ácido clorhídrico 3 N y diluir con agua a volumen.

#### Análisis

**Muestras:** *Solución estándar*, *Solución muestra* y *Solución mezcla*

Dejar que las aplicaciones se sequen y desarrollar el cromatograma en la *Fase móvil*, protegiendo de la luz hasta que el frente de la fase móvil haya recorrido tres cuartos de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara de desarrollo, marcar el frente de la fase móvil y secar la placa al aire hasta que no se detecte ningún olor. Inmediatamente, observar la placa bajo luz UV de longitud de onda corta, registrar las bandas coloreadas y luego rociar la placa con *Solución reveladora*.

**Criterios de aceptación:** Cada solución presenta una banda principal de color azul oscuro al mismo valor  $R_f$  de 0,3 antes de tratarla con *Solución reveladora* y cada solución presenta una banda compacta de color anaranjado claro sobre un fondo amarillo, después de tratarla con *Solución reveladora*.

• **B.** El tiempo de retención de la *Solución muestra* corresponde al de la *Solución estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

#### VALORACIÓN

• **PROCEDIMIENTO:** Proteger la *Solución estándar* y la *Solución muestra* de luz actínica. Realizar la *Valoración* rápidamente después de preparar la *Solución estándar* y la *Solución muestra*.

**Fase móvil:** Acetonitrilo, metanol y agua (25:25:50)

**Solución madre del estándar:** 1 mg/mL de ER Nifedipino USP en metanol

**Solución estándar:** 0,1 mg/mL de ER Nifedipino USP en *Fase móvil*, a partir de *Solución madre del estándar*

**Solución muestra:** 0,1 mg/mL de nifedipino que se prepara según se indica a continuación. Transferir el contenido de 5 Cápsulas con ayuda de una pequeña cantidad de metanol a un matraz volumétrico adecuado y diluir con *Fase móvil* a volumen. Pasar a través de un filtro resistente a los disolventes.

#### Sistema cromatográfico

(Ver *Cromatografía* (621), *Aptitud del Sistema*.)

**Modo:** HPLC

**Detector:** UV 265 nm

**Columnas**

**Guarda columna:** Relleno L1

**Columna analítica:** 4,6 mm  $\times$  25 cm; relleno L1 de 5  $\mu$ m

**Velocidad de flujo:** 1 mL/min

**Volumen de inyección:** 25  $\mu$ L

#### Aptitud del sistema

**Muestra:** *Solución estándar*

**Requisitos de aptitud**

**Eficiencia de la columna:** No menos de 4000 platos teóricos

**Factor de asimetría:** No más de 1,5  
**Desviación estándar relativa:** No más de 1,0%

**Análisis**

**Muestras:** *Solución estándar* y *Solución muestra*  
 Calcular el porcentaje de la cantidad declarada de nifedipino ( $C_{17}H_{18}N_2O_6$ ) en la porción de Cápsulas tomada:

$$\text{Resultado} = (r_u/r_s) \times (C_s/C_u) \times 100$$

$r_u$  = respuesta del pico de nifedipino de la *Solución muestra*

$r_s$  = respuesta del pico de nifedipino de la *Solución estándar*

$C_s$  = concentración de ER Nifedipino USP en la *Solución estándar* (mg/mL)

$C_u$  = concentración nominal de nifedipino en la *Solución muestra* (mg/mL)

**Criterios de aceptación:** 90,0%–110,0%

**PRUEBAS DE DESEMPEÑO****• DISOLUCIÓN (711)**

**Medio:** Fluido gástrico simulado SR (sin pepsina); 900 mL

**Aparato 2:** 50 rpm

**Tiempo:** 20 min

**Solución estándar:** Disolver una cantidad de ER Nifedipino USP en una cantidad de metanol que no exceda el 2% del volumen final y diluir con *Medio* hasta obtener una solución con una concentración conocida adecuada.

**Solución muestra:** Pasar una porción de la solución en análisis a través de un filtro adecuado y diluir con *Medio*, según sea necesario, en comparación con la *Solución estándar*. Se deben controlar los filtros para determinar si hay pérdida de absorción de nifedipino.

**Condiciones instrumentales**

**Modo:** UV

**Longitud de onda analítica:** 340 nm

**Análisis**

**Muestras:** *Solución estándar* y *Solución muestra*  
 Determinar la cantidad disuelta de nifedipino ( $C_{17}H_{18}N_2O_6$ ), como porcentaje de la cantidad declarada, usando absorbancias UV a las longitudes de onda especificadas.

**Tolerancias:** No menos de 80% (Q) de la cantidad declarada de nifedipino ( $C_{17}H_{18}N_2O_6$ )

**• UNIFORMIDAD DE UNIDADES DE DOSIFICACIÓN (905)****Procedimiento para uniformidad de contenido**

**Solución estándar:** 50 µg/mL de ER Nifedipino USP en metanol

**Solución muestra:** Hacer un pequeño agujero en el extremo de 1 Cápsula con la punta de una tijera afilada. Expeler la mayor parte del contenido en un matraz volumétrico de 200 mL, cortar la Cápsula por la mitad y colocarla en el matraz. Enjuagar la tijera con 20 mL de metanol, recolectando cuantitativamente el enjuague en el matraz. Diluir con metanol a volumen.

**Condiciones instrumentales**

**Modo:** UV

**Longitud de onda analítica:** 350 nm

**Celda:** 1 cm

**Blanco:** Metanol

**Análisis**

**Muestras:** *Solución estándar*, *Solución muestra* y *Blanco*

Calcular el porcentaje de la cantidad declarada de nifedipino ( $C_{17}H_{18}N_2O_6$ ) en la Cápsula tomada:

$$\text{Resultado} = (A_u/A_s) \times (C_s/C_u) \times 100$$

$A_u$  = absorbancia de la *Solución muestra*

$A_s$  = absorbancia de la *Solución estándar*

$C_s$  = concentración de ER Nifedipino USP en la *Solución estándar* (µg/mL)

$C_u$  = concentración nominal de nifedipino en la *Solución muestra* (µg/mL)

**Criterios de aceptación:** Cumplen con los requisitos.

**IMPUREZAS**

**• IMPUREZAS ORGÁNICAS:** Proteger la *Solución estándar* y la *Solución muestra* de la luz actínica. Realizar esta prueba rápidamente después de preparar la *Solución estándar* y la *Solución muestra*.

**Fase móvil, Solución muestra y Sistema cromatográfico:** Proceder según se indica en la *Valoración*.

**Solución madre del estándar A:** 1 mg/mL de ER Nifedipino USP en metanol

**Solución estándar A:** 0,3 mg/mL de ER Nifedipino USP, a partir de *Solución madre del estándar A* en *Fase móvil*

**Solución madre del estándar B:** 1 mg/mL de ER Análogo Nitrofenilpiridínico de Nifedipino USP en metanol  
**Solución estándar B:** 6 µg/mL de ER Análogo Nitrofenilpiridínico de Nifedipino USP en *Fase móvil*, a partir de *Solución madre del estándar B*

**Solución madre del estándar C:** 1 mg/mL de ER Análogo Nitrosufenilpiridínico de Nifedipino USP en metanol

**Solución estándar C:** 1,5 µg/mL de ER Análogo Nitrosufenilpiridínico de Nifedipino USP en *Fase móvil*, a partir de *Solución madre del estándar C*

**Solución estándar D:** Mezcla de *Solución estándar B*, *Solución estándar C* y *Fase móvil* (1:1:1)

**Solución de aptitud del sistema:** Mezcla de *Solución estándar A*, *Solución estándar B* y *Solución estándar C* (1:1:1)

Proceder según se indica en la *Valoración*.

**Aptitud del sistema**

**Muestra:** *Solución de aptitud del sistema*

**Requisitos de aptitud**

**Resolución:** No menos de 1,5 entre los picos de análogo nitrofenilpiridínico de nifedipino y análogo nitrosufenilpiridínico de nifedipino, y no menos de 1,0 entre los picos de análogo nitrosufenilpiridínico de nifedipino y nifedipino

**Desviación estándar relativa:** No más de 10% para los picos de análogo de nitrofenilpiridínico de nifedipino y de análogo nitrosufenilpiridínico de nifedipino

**Análisis**

**Muestras:** *Solución estándar D* y *Solución muestra*  
 Calcular el porcentaje de análogo nitrofenilpiridínico de nifedipino y análogo nitrosufenilpiridínico de nifedipino en la porción de Cápsulas tomada:

$$\text{Resultado} = (r_u/r_s) \times (C_s/C_u) \times 100$$

$r_u$  = respuesta del pico de análogo nitrofenilpiridínico de nifedipino o de análogo nitrosufenilpiridínico de nifedipino de la *Solución muestra*

$r_s$  = respuesta del pico de análogo nitrofenilpiridínico de nifedipino o de análogo nitrosufenilpiridínico de nifedipino de la *Solución estándar D*

$C_s$  = concentración de ER Análogo Nitrofenilpiridínico de Nifedipino USP o de ER Análogo Nitrosufenilpiridínico de Nifedipino USP apropiado en la *Solución estándar D* (mg/mL)

$C_u$  = concentración nominal de nifedipino en la *Solución muestra* (mg/mL)

**Criterios de aceptación:** Ver la *Tabla 1*.

Tabla 1

| Nombre  | Tiempo de Retención Relativo | Criterios de Aceptación, No más de (%) |
|---|------------------------------|--|
| Análogo nitrofenilpiridínico de nifedipino <sup>a</sup>   | 0,8                          | 2,0                                    |
| Análogo nitrosofenilpiridínico de nifedipino <sup>b</sup> | 0,9                          | 0,5                                    |
| Nifedipino  | 1,0                          | —                                      |

<sup>a</sup> 4-(2-Nitrofenil)-2,6-dimetilpiridina-3,5-dicarboxilato de dimetilo.

<sup>b</sup> 4-(2-Nitrosofenil)-2,6-dimetilpiridina-3,5-dicarboxilato de dimetilo.

#### REQUISITOS ADICIONALES

- **ENVASADO Y ALMACENAMIENTO:** Conservar en envases impermeables y resistentes a la luz. Almacenar a una temperatura entre 15° y 25°.
- **ESTÁNDARES DE REFERENCIA USP (11)**
  - ER Nifedipino USP
  - ER Análogo Nitrofenilpiridínico de Nifedipino USP  
4-(2-Nitrofenil)-2,6-dimetilpiridina-3,5-dicarboxilato de dimetilo.  
 $C_{17}H_{16}N_2O_6$  344,33
  - ER Análogo Nitrosofenilpiridínico de Nifedipino USP  
4-(2-Nitrosofenil)-2,6-dimetilpiridina-3,5-dicarboxilato de dimetilo.  
 $C_{17}H_{16}N_2O_5$  328,33