



**Universidad de Concepción
Facultad de Farmacia
Departamento de Farmacia**

**VALIDACIÓN DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
NIFEDIPINO COMPRIMIDOS LIBERACIÓN
PROLONGADA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA
DE ALTA EFICIENCIA**

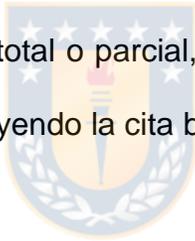
POR PAMELA ANDREA VALENZUELA BELLO

**Seminario de internado presentado a la Facultad de Farmacia de la
Universidad de Concepción para optar al título profesional de química
farmacéutica**

Profesor Guía: MSc. Marta Gloria de Diego Glaria

**Marzo, 2020
Concepción, Chile**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.





*Dedicado a mis padres, hermanos y amigos,
que me apoyaron durante mis años universitarios.*

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia agradezco a los profesores Marta de Diego y Ricardo Godoy por la oportunidad de hacer mi trabajo en la industria farmacéutica.

También, agradecer al laboratorio ITF-Labomed por permitirme realizar mi seminario de internado en sus dependencias, pero especialmente agradezco de todo corazón a la supervisora de Validaciones srta. Macarena Lavín M. por todo el apoyo y sabiduría entregada. Sin su tutela mi trabajo no podría haber sido realizado ni terminado con éxito.



Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo general	5
2.2. Objetivos específicos.....	5
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
3.1. Materiales.....	6
3.2. Metodologías.....	10
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
4.1. Redacción protocolo de validación de metodología analítica.....	29
4.2. Aptitud del sistema	29
4.3. Linealidad	30
4.4. Exactitud.....	36
4.5. Precisión.....	39
4.6. Especificidad	42
4.7. Robustez	44
4.8. Estabilidad de soluciones	45
4.9. Rango.....	47
5. CONCLUSIONES.....	48
6. GLOSARIO.....	50
7. BIBLIOGRAFÍA.....	52
8. ANEXOS	53

Índice de tablas

Tabla N° 1: Propiedades fisicoquímicas.....	4
Tabla N° 2: Equipos.....	8
Tabla N° 3: Reactivos.....	9
Tabla N° 4: Materia prima.....	9
Tabla N° 5: Estándar.....	10
Tabla N° 6: Columnas.....	10
Tabla N° 7: Niveles de concentración linealidad.....	16
Tabla N° 8: Niveles de concentración exactitud.....	18
Tabla N° 11: Matriz de análisis precisión intermedia.....	21
Tabla N° 12: Cálculo ANOVA precisión intermedia.....	22
Tabla N° 13: Matriz de cambios en robustez.....	26
Tabla N° 14: Resultados de linealidad.....	31
Tabla N° 13: Resultados regresión lineal.....	32
Tabla N° 14: Resultados t Student linealidad.....	34
Tabla N° 15: Homogeneidad de varianzas linealidad.....	34
Tabla N° 16: Cálculos de ANOVA linealidad.....	35
Tabla N° 17: Resultados ANOVA linealidad.....	35
Tabla N° 18: Resultados factor de respuesta linealidad.....	36
Tabla N° 19: Resultados exactitud.....	37
Tabla N° 20: Homogeneidad de varianzas exactitud.....	37
Tabla N° 21: Homogeneidad de varianzas recobro.....	38
Tabla N° 22: Resultados repetibilidad del sistema.....	39
Tabla N° 23: Resultados analista 1 equipo 1.....	40
Tabla N° 24: Resultados analista 1 equipo 2.....	41
Tabla N° 25: Resultados analista 2 equipo 1.....	41
Tabla N° 26: Resultados analista 2 equipo 2.....	42
Tabla N° 27: Resultado degradaciones forzadas.....	43
Tabla N° 28: Resultados estándar robustez.....	44
Tabla N° 29: Resultados muestra robustez.....	45
Tabla N° 30: Resultados estabilidad para estándar.....	46
Tabla N° 31: Resultados estabilidad para muestra.....	46

Índice de ilustraciones

Figura N° 1: Estructura química Nifedipino	3
Figura N° 2: Gráfico regresión lineal	31
Figura N° 3: Gráfico residuales	33



Resumen

Este trabajo tuvo como objetivo la validación de la metodología analítica para el producto terminado de Nifedipino 20 mg comprimidos de liberación prolongada, usando la metodología descrita en la farmacopea 41 de Estados Unidos para la prueba de valoración.

El análisis se realizó mediante un método de cromatografía de líquidos de alta eficiencia con un detector de arreglo de diodos, utilizando una longitud de onda de 265 nm, una columna Perkin Elmer C-18 (250mmx 4,6 mm; 5 μ m), una fase móvil compuesta de agua, metanol y acetonitrilo, flujo 1,5 mL/min, temperatura de columna de 25°C y un volumen de inyección de 25 μ L.

Los parámetros validados fueron linealidad, exactitud, precisión, robustez, especificidad, estabilidad de soluciones y rango.

Se determinó que el rango de concentración que cumple con los criterios de especificación de precisión, exactitud y linealidad es de 0,08 mg/mL a 0,12 mg/mL, además, no se encontró interferencias en la cuantificación del principio activo y el método se presentó robusto a las variaciones realizadas.

Se concluye, que la metodología es adecuada para el análisis de valoración para los criterios de aceptación previamente descritos.

Abstract

The objective of this work was the validation of the analytical methodology for the finished product of Nifedipine 20 mg extended-release tablets, using the methodology described in the United States Pharmacopoeia 41 for the assay test.

The analysis was performed by a high-performance liquid chromatography with a diode array detector, using a wavelength of 265 nm, a C-18 Perkin Elmer column (250mm x 4.6mm; 5 μ m), using a mobile phase composed of water, methanol and acetonitrile, at 1.5 mL/min flow rate, column temperature of 25 ° C and an injection volume of 25 μ L.

The validated parameters were linearity, accuracy, precision, robustness, specificity, stability of solutions and range.

It was determined that the concentration range that meets the specification criteria of accuracy, precision and linearity is 0,08 mg / mL to 0,12 mg / mL, in addition, no interference was found in the quantification of the active substance and the method was robust to the variations made.

It is concluded that the methodology is suitable for the analysis of assay for the previously established acceptance criteria.

1. INTRODUCCIÓN

Desde tiempos prehistóricos el ser humano ha buscado los mejores tratamientos a las enfermedades que lo aquejan, ya sea con el uso de medicina tradicional como infusiones de hierbas, o con la medicina que actualmente conocemos, que cada vez sorprende con su avanzada tecnología.

“En 1888 los químicos de la compañía Bayer, en aquel entonces importante industria de los tintes, a partir del paranitrofenol, sustancia de desecho de los tintes, sintetizaron la fenacetina, primer fármaco sintético” (Labrada *et al.*, 1999), desde ese momento la industria farmacéutica ha tenido el rol principal en el descubrimiento, producción y distribución de nuevos tratamientos para la población. Su misión es entregar medicamentos que sean seguros y eficaces producidos bajo rigurosos controles de producción, envasado y distribución.

Según Guzmán (2002) en Chile, la industria farmacéutica está presente hace más de 100 años con diversas empresas provenientes de todo el mundo.

ITF- Labomed farmacéutica limitada, es una empresa con años en el rubro de la industria farmacéutica. Una empresa proveniente de la fusión con el grupo Italfármaco proveniente de Italia y la empresa Labomed proveniente de Chile.

ITF- Labomed es una empresa con años de experiencia en el desarrollo, producción y validación de productos farmacéuticos, cuya planta se encuentra en Santiago de Chile.

Sus productos farmacéuticos son elaborados bajo minuciosos requerimientos para asegurar su buena calidad. Es por eso que en ITF-Labomed se encuentra un área específica denominada control de calidad, la cual se encarga de realizar los análisis pertinentes a las materias primas antes de ser utilizadas en la fabricación de medicamentos, y a los productos que están destinados a ser comercializados a lo largo del país y así asegurar su calidad.

Para asegurar la calidad de los productos farmacéuticos, se deben validar los métodos analíticos utilizados en los análisis de rutina. Para este proceso en ITF-Labomed existe una subárea llamada, validaciones de metodologías analíticas, ubicada dentro del área de control de calidad.

Esta área está encargada de validar las metodologías analíticas, para así obtener resultados fiables dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos por las autoridades sanitarias y parámetros de calidad internamente propuestos.

En este trabajo se realizó la validación de metodología analítica del producto terminado de Nifedipino 20 mg, en comprimidos de liberación prolongada según la farmacopea 41 de Estados Unidos para la prueba de valoración.

Nifedipino (figura 1) es un antagonista de los canales de calcio del tipo dihidropiridina, inhibe la entrada transmembrana de iones de calcio extracelulares a través de las membranas de células del músculo liso miocárdico. Esto da como resultado la inhibición de la contracción del músculo liso cardíaco y vascular, dilatando así las arterias coronarias y sistémicas principales. Generando, por lo tanto una vasodilatación con disminución de la resistencia periférica y aumento de la frecuencia cardíaca. (Reference.medscape.com, 2019)

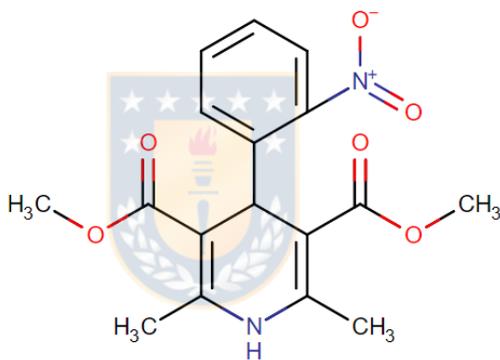


Figura N° 1: Estructura química del Nifedipino

En la Tabla N°1 se muestran las propiedades fisicoquímicas de Nifedipino ("Chemicalize - Instant Cheminformatics Solutions", 2019).

Nombre IUPAC	2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato de dimetilo
Formula Molecular	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₆
Peso molecular	346.339 g/mol
Descripción	Polvo cristalino amarillo
Solubilidad	<p>Prácticamente insoluble en agua</p> <p>Libremente soluble en acetona</p> <p>Muy soluble en cloroformo</p> <p>Soluble en etanol y metanol</p>

Tabla N° 1: Propiedades fisicoquímicas Nifedipino

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Validar la Metodología Analítica para el producto terminado de Nifedipino 20 mg comprimidos de liberación prolongada para el test de valoración.

2.2. Objetivos específicos

- Redactar protocolo de Validación de Metodología Analítica Nifedipino 20 mg comprimidos de liberación prolongada.
- Ejecutar pruebas incluidas en el protocolo de Validación de Metodología Analítica Nifedipino 20 mg comprimidos de liberación prolongada.
- Recopilar y analizar estadísticamente los resultados obtenidos en la Validación de Metodología Analítica Nifedipino 20 mg comprimidos de liberación prolongada.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo el presente trabajo se ocuparon los siguientes materiales y métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Material de vidrio

- Filtro de membrana PVDF de 0,45 μm (Merck)
- Frasco schott (Duran)
- Matraces volumétricos ámbar de 20 mL, 50 mL y 250 mL (Isolab)
- Pipetas aforadas de 3 mL y 5 mL (Isolab)
- Propipeta (Hirschmann)
- Tubo para centrifuga 15 mL (Isolab)
- Vaso precipitado de 250 mL (Isolab)
- Viales ámbar (Isolab)

3.1.2. Equipos

En la Tabla N° 2 se muestran los equipos utilizados.

Nombre	Fabricante	Modelo	Serie
Agitador magnético	Thermoline	Cimareg 3	610920147833
Agitador magnético	Thermoline	Cimareg 3	610920147829
Agitador orbital	Sea Star	HS4020A	Hsa01507
Agitador orbital	Sea Star	HS4020A	Hsa01515
Aparato de destilación Milli-Q	Merck	Milli Q Advantage A10	F4da45950-a
Balanza analítica	Mettler Toledo	MI 204/01	B105108392
Balanza analítica	Mettler Toledo	MI 204	B233210539
Balanza Granataria	Mettler Toledo	PI502-05	B102101530
Bomba de vacío	Rocker	Rocker 801	167801-22-aga025
Centrifuga	Hermile	Z230a	23950120
HPLC-14	Merck	CM-5430 (DAD)	1214-007 (DAD)
		CM-5110 (Bomba)	1209a-015 (Bomba)
		CM-5310 (Horno)	1214-016 (Horno)
		CM-5210 (Autosampler)	1210-00 (Autosampler)
HPLC-09	Merck	CM 5430 (DAD)	1207-010 (DAD)
		CM- 5110 (Bomba)	1103a-024 (Bomba)

		CM-5310 (Horno)	1107-008 (Horno)
		CM-5210 (Autosampler)	1104-020 (Autosampler)
Lámpara UV	Camag	022E230	000418
Manto calefactor	Mundolab	HMP-F250	E2440lh0014
Placa calefactora	Fisatom	509	1215286

Tabla N° 2: Equipos



3.1.3. Reactivos

En la Tabla N° 3 se muestran los reactivos utilizados.

Reactivo	Fabricante	Lote
Acetonitrilo grado HPLC	JT. Baker	A03C64
Acetonitrilo grado HPLC	Merck	I0906330732
Acetonitrilo grado HPLC	Merck	I0916730740
Ácido clorhídrico 0,1 N	Merck	HC86893460
Agua purificada	Planta de agua laboratorio	02082019M11
Agua purificada	Planta de agua laboratorio	07082019M11
Agua purificada	Planta de agua laboratorio	17072019M11

Agua purificada	Planta de agua laboratorio	19072019M11
Agua purificada	Planta de agua laboratorio	30072019M11
Agua purificada	Planta de agua laboratorio	31072019M11
Hidróxido de Sodio 0,5 N	Merck	HC69959038
Metanol grado HPLC	Merck	I0980107843
Metanol grado HPLC	JT. Baker	Y49C35
Peróxido de hidrógeno 30%	Merck	K49965010806

Tabla N° 3: Reactivos



3.1.4. Materias primas

En la Tabla N° 4 se muestra la materia prima utilizada.

Nombre	Fabricante	Pureza	Vencimiento
Nifedipino	Dy- Mach Pharma	99,2%	28/02/2024

Tabla N° 4: Materia prima

3.1.5. Estándares

En la Tabla N° 5 se muestra el estándar utilizado.

Nombre	Fabricante	Pureza
Nifedipino	Dy- Mach Pharma	99,7%

Tabla N° 5: Estándar

3.1.6. Columnas

En la Tabla N° 6 se muestran las columnas utilizadas.

Fabricante	Modelo	Relleno	Dimensiones
Perkin Elmer	Universal	C18	250x4,6mmx5µm
Waters	Symmetry	C18	250x4,6mmx5µm

Tabla N° 6: Columnas

3.2. Metodologías

La metodología analítica se obtuvo de la farmacopea The United States Pharmacopeia 41, en la monografía de Nifedipino, Tabletas de Liberación Prolongada. (United States Pharmacopeia and National Formulary, 2017, p. 2938-2939). A partir de esta monografía se redactó el protocolo de validación de metodologías analíticas que describe la preparación de las muestras y los parámetros a validar.

3.2.1. Metodología analítica para valoración

3.2.1.1. Condiciones cromatográficas según USP

Columna	: C-18; 250 mm x 4,6 mm; 5 μ m o similar
Guarda columna	: C-18; 2,1 mm x 30 mm
Temperatura	: 25 \pm 2°C
Longitud de onda	: UV 265 nm
Flujo	: 1,0 mL / minuto
Volumen de inyección	: 25 μ L
Fase Móvil	: acetonitrilo: metanol: agua (25:25:50 v/v/v)

Al desarrollar la metodología se ajustó la fase móvil y el flujo para obtener el pico cromatográfico en menor tiempo de retención, además para disminuir costos se eliminó el uso del guarda columna, con estas modificaciones la metodología utilizada quedó de la siguiente forma.

3.2.1.2. Condiciones cromatográficas utilizadas

Columna	: C-18; 250 mm x 4,6 mm; 5 μ m o similar
Temperatura	: 25 \pm 2°C
Longitud de onda	: UV 265 nm
Flujo	: 1,5 mL / minuto
Volumen de inyección	: 25 μ L
Fase Móvil	: acetonitrilo: metanol: agua (30:25:45 v/v/v)

3.2.1.3. Preparación de las soluciones



3.2.1.3.1. Fase Móvil

En un recipiente apropiado para 2000 mL, se agregó 600 mL de acetonitrilo, 500 mL de metanol grado HPLC y 900 mL de agua purificada. Luego se filtró la solución al vacío con filtro de 0,45 μ m de poro.

3.2.1.3.2. Solución Estándar

Se pesó exactamente alrededor de 20,0 mg de estándar de Nifedipino y se transfirió a un matraz aforado ámbar de 20 mL y se aforó con metanol. De la solución anterior se tomó una alícuota de 5 mL, se transfirió a un matraz aforado ámbar de 50 mL y se aforó con fase móvil. Finalmente se filtró con filtro de

membrana 0,45 μm de diámetro de poro y se inyectó inmediatamente.
Concentración solución estándar: 0,1 mg/mL.

3.2.1.3.3. Solvente

En un recipiente adecuado se mezcló 500 mL de acetonitrilo con 500 mL de metanol (1:1).

3.2.1.3.4. Solución muestra

Se disolvió una cantidad equivalente a 420,0 mg de Nifedipino a partir de 30 tabletas reducidas a polvo, en 180 mL de solvente en un matraz aforado ámbar de 250 mL y se agitó de forma mecánica durante 30 minutos a 200 rpm, luego se llevó a volumen con solvente. Después, la solución resultante se centrifugó por 30 minutos a 3000 rpm, hasta obtener un sobrenadante transparente. Se transfirió 3,0 mL del sobrenadante a un matraz ámbar de 50 mL y se llevó a volumen con fase móvil, luego se filtró con filtro de membrana 0,45 μm de poro.
Concentración muestra valoración: 0,1 mg/mL.

3.2.2. Parámetros de validación

3.2.2.1. Aptitud del sistema

3.2.2.1.1. Procedimiento

Se preparó una solución estándar de concentración 0,1 mg/mL de acuerdo a la metodología analítica y se inyectó 5 veces en forma consecutiva. Con respecto al pico de Nifedipino en la solución estándar, se obtuvieron los platos teóricos, factor de asimetría y la desviación estándar relativa (RSD) entre áreas obtenidas.

Se calculó según las siguientes ecuaciones:

- Platos teóricos (A.E.F.I, 2001 (p. 109)

$$N = 16 \cdot \left(\frac{R_t}{W} \right)^2$$

Donde:

R_t : Tiempo de retención

W : La anchura del pico en la línea base determinado por la tangente ajustada a un % de la altura del pico

- Factor de asimetría (A.E.F.I, 2001 (p. 110)

$$T = \frac{W_{0,05}}{2F}$$

Donde:

$W_{0,05}$: Anchura de pico al 5% de la altura del pico

F : Distancia entre la perpendicular trazada desde el máximo del pico y el frente al 5% de la altura del pico.

- Desviación estándar relativa (A.E.F.I., 2001 (p.11))

$$CV\% = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100$$

Donde:

S : Desviación estándar áreas obtenida

\bar{x} : Promedio áreas obtenidas



3.2.2.1.2. Criterios de aceptación

- Platos teóricos (N) \geq 4000
- Factor de Asimetría (T) \leq 1,5
- RSD entre áreas obtenidas \leq 1,0 %

3.2.2.2. Linealidad

3.2.2.2.1. Procedimiento

Se preparó una solución de placebo cargado, correspondiente a una mezcla de excipientes cargado con una cantidad conocida de materia prima de Nifedipino. Se preparó cada nivel de concentración en forma independiente (cada nivel en triplicado), tomando el 100% como la concentración de trabajo.

Se inyectó cada nivel de concentración en duplicado. Los niveles de concentración y la preparación de las muestras se detallan en la Tabla N°7.

Nivel (%)	Peso Nifedipino [mg]	Peso Placebo [mg]	Aforo 1 [mL]	Alícuota [mL]	Aforo 2 [mL]	Concentración Nifedipino [mg/mL]
80	336	2289	250	3	50	0,08
90	378	2247	250	3	50	0,09
100	420	2205	250	3	50	0,10
110	462	2163	250	3	50	0,11
120	504	2121	250	3	50	0,12

Tabla N° 7: Niveles de concentración linealidad

Dados los resultados, se graficó los datos de concentración (x) v/s el área observada (y), con lo cual se obtuvo la ecuación de la recta, el coeficiente de

correlación (r) y coeficiente de determinación (r^2). Se calculó el valor t a través de t de student para evaluar si existía una correlación lineal significativa. Además, se graficó los residuales y se realizó el análisis de varianza a través de ANOVA. Luego se realizó el análisis del RSD de los factores de respuestas según la siguiente fórmula. (A.E.F.I., 2001 (p. 63)

$$fr_i = \frac{(y_i - a)}{x_i}$$

Donde:

fr_i : Factor de respuesta corregido con intercepto

y_i : Dato de la respuesta de la medición

x_i : Dato de la medición

s_{fr} : Desviación estándar de los factores de respuesta corregidos

fr : Promedio de los factores de respuesta corregidos

3.2.2.2.2. Criterios de aceptación

- El coeficiente de correlación y de determinación obtenido debe ser igual o mayor a 0,990
- El valor t calculado debe ser superior al t tabulado
- El valor G calculado debe ser menor al G tabulado
- El valor F calculado debe ser mayor al F tabulado

- El RSD calculado debe ser menor o igual a un 2,00%

3.2.2.3. Exactitud

3.2.2.3.1. Procedimiento

Se prepararon soluciones de placebo cargado por triplicado, a 3 niveles de concentración: 80%, 100% y 120% con respecto a la concentración de trabajo del principio activo al 100%.

Se inyectó cada nivel de concentración en duplicado.

Los niveles de concentración y la preparación de las muestras se detallan en la Tabla N° 8

Nivel (%)	Peso Nifedipino [mg]	Peso Placebo [mg]	Aforo 1 [mL]	Alícuota [mL]	Aforo 2 [mL]	Concentración Nifedipino [mg/mL]
80	336	2289	250	3	50	0,08
100	420	2205	250	3	50	0,10
120	504	2121	250	3	50	0,12

Tabla N° 8: Niveles de concentración exactitud

Dados los resultados, se calculó el recobro de cada una de las mediciones y se comprobó que no exista diferencia significativa entre el valor 100% y el promedio

del recobro a través de t de Student, además se calculó la homogeneidad de varianzas mediante el test de Cochran según la siguiente formula (A.E.F.I., 2001 (p. 62):

$$G_{exp} = \frac{S^2_{m\acute{a}xima}}{\sum S_i^2} = \frac{S^2_{m\acute{a}xima}}{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + S_4^2 + S_5^2}$$

Dónde:

S_i^2 : Varianza de cada grupo K.
 $S^2_{m\acute{a}xima}$: Varianza máxima de los k grupos.

3.2.2.3.2. Criterios de aceptación

- El promedio del recobro debía estar entre 97,0-103,0%
- El t calculado debía ser menor al t tabulado
- El G calculado tenía que ser menor al G de tabla

3.2.2.4. Precisión

3.2.2.4.1. Repetibilidad del sistema:

3.2.2.4.1.1. Procedimiento

Se preparó una solución estándar de concentración 0,1 mg/mL según indica la metodología (sección 3.2.1.3.2) y se analizó de manera consecutiva 6 veces. Se

obtuvieron los datos de concentración experimental y teórica, luego se calculó el recobro, y se calculó el coeficiente de variación según: (A.E.F.I., 2001 (p. 69)

$$\%CV = \frac{S}{X} * 100$$

Donde:

S: Desviación estándar

X: Promedio de los resultados

3.2.2.4.1.2. Criterios de aceptación

El RSD del recobro debía ser menor o igual al 2,00%

3.2.2.4.2. Repetibilidad del método

3.2.2.4.2.1. Procedimiento

Se prepararon soluciones de placebo cargado por triplicado, a 3 niveles de concentración: 80%, 100% y 120% con respecto a la concentración de trabajo del principio activo al 100%. Se inyectó cada nivel de concentración en duplicado. Los niveles de concentración y la preparación de las muestras se detallan en la Tabla N° 8 (sección 3.2.2.3.1).

Se obtuvieron los datos de concentración experimental y teórica para calcular el recobro del analito, una vez calculado el recobro se calculó el coeficiente de variación de este.

3.2.2.4.2.2. Criterio de aceptación

El RSD del recobro debía ser menor o igual al 2,00%

3.2.2.4.3. Precisión intermedia

Con la disponibilidad de un segundo analista y un segundo equipo, se prepararon soluciones de placebo cargado por triplicado, a 3 niveles de concentración: 80%, 100% y 120% con respecto a la concentración de trabajo al 100% (9 soluciones en total), tal como se detalla en la Tabla N° 8 (sección 3.2.2.3.1).

Se realizaron los análisis modificando las variables según se muestra en la Tabla N°9:

Analista 1 – Equipo 1
Analista 1 – Equipo 2
Analista 2 – Equipo 1
Analista 2 – Equipo 2

Tabla N° 9: Matriz de análisis precisión intermedia

Se obtuvieron los datos de concentración experimental y teórica, luego se calculó el recobro y se calculó el coeficiente de variación. Además, se realizó una comparación de medias de recobros a través de ANOVA, según la Tabla N°10: (Instituto de Salud Pública, 2010 (p.19))

Origen de la varianza	Suma de cuadrados (SC)	Grados de Libertad (GL)
Entre grupos (B)	$SC_B = \frac{\sum_{i=1}^n (\sum X_i)^2}{n_i} - \frac{(\sum \sum X)^2}{N}$	$n' - 1$
Dentro del grupo (w)	$SC_w = \sum \sum (x_i^2) - \frac{(\sum \sum x)^2}{N} - SC_B$	$GL_{total} - GL_B$
Totales	$SC_{tot} = SC_B + SC_w$	$N - 1$

Tabla N°10: Cálculo ANOVA precisión intermedia

Dónde:

n': número de grupos

N: número de observaciones totales

Luego se calculó el Valor F según:

$$F_{exp} = \frac{(SC_B/GL_B)}{(SC_w/GL_w)}$$

Una vez calculado el estadístico F_{exp} , se comparó con su correspondiente valor tabulado.

3.2.2.4.3.1. Criterios de aceptación

- RSD de recobro obtenido no debía ser mayor o igual al 2,00%
- El F calculado debía ser mayor al F tabulado

3.2.2.5. Especificidad

3.2.2.5.1. Procedimiento

Se prepararon las siguientes soluciones y se inyectaron en el sistema cromatográfico



- Solución muestra
- Solución estándar
- Solución solvente
- Solución Placebo

Luego a la solución muestra de concentración 0,1 mg/mL, se le realizó un estudio de degradaciones forzadas, que consistió en agregarle sustancias degradantes antes de realizar el último aforo, con el objetivo de determinar a qué degradante era sensible la muestra. La prueba se realizó tal como se describe a continuación:

- Termólisis de muestra: Consistió en calentar solución muestra del análisis en baño termostático por dos horas a $70 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Hidrólisis ácida: Se agregó ácido clorhídrico 0,1 N considerando el 10% de la capacidad del matraz de la solución muestra y se calentó en el baño termostático durante dos horas a $50 \pm 2^\circ\text{C}$
- Hidrólisis básica: Consistió en agregar hidróxido de sodio 0,1 N considerando el 10% de la capacidad del matraz de la solución muestra y se calentó en el baño termostático durante dos horas a $50 \pm 2^\circ\text{C}$
- Oxidación: La prueba consistió en agregar peróxido de hidrogeno al 3% considerando el 10% de la capacidad del matraz de la solución muestra y se calentó en el baño termostático por dos horas a $50 \pm 2^\circ\text{C}$.

Se verificaron los cromatogramas obtenidos de las soluciones blanco, placebo y muestra de manera que no existieran señales provenientes de la matriz de la muestra que pudieran interferir en la identificación o cuantificación del analito.

Para el estudio de degradaciones forzadas, se calculó el grado de discrepancia en presencia o ausencia de las posibles interferencias, mediante la siguiente formula: (A.E.F.I., 2001 (p. 51)

$$\% \text{ discrepancia} = \frac{(D_i - D_s)}{D_s} * 100$$

Donde:

Di: Respuesta promedio con interferencias

Ds: Respuesta promedio sin interferencias

3.2.2.5.2. Criterios de aceptación

En los cromatogramas, el pico observado debe corresponder a una sola especie química, ninguna otra sustancia presente en la muestra debe eluir a un tiempo parecido al del analito de interés.

Para el estudio de degradaciones forzadas, se aceptó un máximo de 10,00% de degradación del analito, para que este sea sensible a esa degradación.

3.2.2.6. Robustez



3.2.2.6.1. Procedimiento

Se preparó una solución estándar y una solución muestra según lo descrito en la metodología analítica (sección 3.2.1.3). Se inyectó por triplicado cada solución en condiciones cromatográficas normales y también se inyectaron luego de haber realizado las modificaciones a las condiciones cromatográficas originales del método, según la matriz establecida en la Tabla N°11.

Variación	1	2	3	4	5	6	7	8
Columna	C-18 Perkin Elmer	C-18 Perkin Elmer	C-18 Perkin Elmer	C-18 Perkin Elmer	C-18 Simetry	C-18 Simetry	C-18 Simetry	C-18 Simetry
T° de Columna	25 °C	25 °C	30°C	30°C	25°C	25°C	30°C	30°C
Flujo	1,0 mL/min	1,2 mL/min	1,0 mL/min	1,2 mL/min	1,0 mL/min	1,2 mL/min	1,0 mL/min	1,2 mL/min
Vol. de inyección	25 µL	25 µL	30 µL	30 µL	30 µL	30 µL	25 µL	25 µL
Longitud de onda	265 nm	270 nm	265 nm	270 nm	270 nm	265 nm	270 nm	265 nm
Proporción FM	25:25: 50	20:20: 60	20:20: 60	25:25: 50	25:25: 50	20:20: 60	20:20: 60	25:25: 50
Filtro	0,45	0,22	0,22	0,45	0,22	0,45	0,45	0,22

Tabla N°11: Matriz de cambios en robustez

Dados los resultados, se calculó el efecto que supone utilizar el valor indicado en el método y el alternativo. Dicho efecto se calculó como la media de los resultados obtenidos en los experimentos en los que se utilizó.

Para cada factor se calculó el efecto que supone utilizando los recobros obtenidos en las 8 diferentes pruebas, según la siguiente formula: (A.E.F.I., 2001 (p. 104)

$$F1 - F1' = \frac{(s + t + u + v)}{4} - \frac{(w + x + y + z)}{4}$$

Donde:

F1: Valor nominal

F1': Valor alternativo

s, t, u, v, w, x, y, z: Resultado de cada experimento

3.2.2.6.2. Criterio de aceptación

La influencia de un factor fue relevante cuando se compararon los valores del efecto (F-F') con la expresión $s\sqrt{2}$, donde s es la desviación estándar obtenida en el ensayo de repetibilidad del método al 100%. Las diferencias superiores en valor absoluto al resultado de esta expresión se consideraron significativas.

3.2.2.7. Estabilidad de soluciones



3.2.2.7.1. Procedimiento

Se preparó por duplicado una solución estándar y una solución muestra, las cuales fueron evaluadas instrumentalmente contra una solución estándar preparada al momento del análisis, siendo este análisis considerado como tiempo cero (t0). Luego se almacenó una solución estándar y una solución muestra a temperatura ambiente (20-25°C) y refrigerada (2-8°C). Transcurrido 24, 48 y 72 horas se analizaron las soluciones frente a un estándar recién preparado.

Transcurrido el tiempo se midió el recobro de cada una de estas soluciones y se calculó el porcentaje de degradación según: (A.E.F.I., 2001 (p. 51)

$$\% \text{ de Degradación} = 100 - \left(\frac{100 \times \text{Recobro degradado}}{\text{Recobro condición normal}} \right)$$

3.2.2.7.2. Criterio de aceptación

El recobro en comparación a la condición normal no debía superar el 2,00%.

3.2.2.8. Rango

3.2.2.8.1. Procedimiento

De los resultados obtenidos en los parámetros de validación se determinó el rango de concentraciones en que el método analítico cumplió los requisitos de precisión, exactitud y linealidad establecidos.

3.2.2.8.2. Criterio de aceptación

El resultado es de carácter informativo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Redacción protocolo de validación de metodología analítica

Se redactó el protocolo de validación siguiendo el formato interno del laboratorio para protocolos de validación de metodología analítica el que fue revisado por la supervisora de validaciones y la jefa de control de calidad y aprobado por el jefe de aseguramiento de la calidad.

En el anexo N° 1 se adjunta la portada del protocolo.



4.2. Aptitud del sistema

“Las pruebas se basan en el concepto de que el equipo, los sistemas electrónicos, las operaciones analíticas y las muestras analizadas constituyen un sistema integral que se puede evaluar como tal”. (United States Pharmacopeial Convention. 2017 (p. 554)

El número de platos teóricos obtenidos muestra la capacidad del sistema de proporcionar bandas de elución estrechas (A.E.F.I., 2001 (p. 108), en este caso se cumplió con lo establecido con un valor de 9797 platos teóricos.

El factor de asimetría para este análisis fue de 1,2, este factor es una medida de la asimetría de la señal producida por el pico del analito. “Un peak simétrico

tendrá una asimetría cercana al 1,0” (A.E.F.I., 2001 (p. 109), lo que permite una mejor y precisa cuantificación.

“La desviación estándar relativa calcula la precisión que existe sobre los resultados obtenidos, demostrando que las respuestas son semejantes entre sí” (A.E.F.I., 2001 (p. 106).

En este análisis se cumplió con lo establecido de tener un RSD menor al 1% con un valor de 0,1%.

4.3. Linealidad

En la Tabla N°12, se pueden observar los resultados obtenidos a partir de las soluciones preparadas en los diversos niveles de concentración.

Nivel [%]	N° Muestra	Peso Materia Prima [mg]	Concentración [mg/mL]	Área	Área Promedio
80	M1	336,6	0,080	4645923	4647692,5
				4649462	
	M2	336,7	0,080	4640781	4639744,0
				4638707	
	M3	336,7	0,080	4630705	4631863,5
				4633022	
90	M1	379,8	0,090	5252356	5251075,5
				5249795	
	M2	378,5	0,090	5228291	5230809,0
				5233327	
	M3	378,7	0,090	5225903	5226255,0
				5226607	
100	M1	420,2	0,100	5705152	5704840,0
				5704528	
	M2	420,2	0,100	5762614	5762988,0
				5763362	

	M3	420,6	0,100	5760822 5759528	5760175,0
110	M1	462,5	0,110	9567 6416299	6416299,0
	M2	462,8	0,110	6368940 6384591	6376765,5
	M3	462,6	0,110	6388173 6385011	6386592,0
120	M1	504,5	0,120	6954571 6954606	6954588,5
	M2	504,7	0,120	6968927 6970003	6969465,0
	M3	504,9	0,120	6995409 7002579	6998994,0

Tabla N°12: Resultados de linealidad

En el nivel 110% en la muestra uno, se eliminó un dato debido a un error en el inyector del HPLC.



En la figura N°2, se representan los resultados obtenidos en la Tabla N° 12

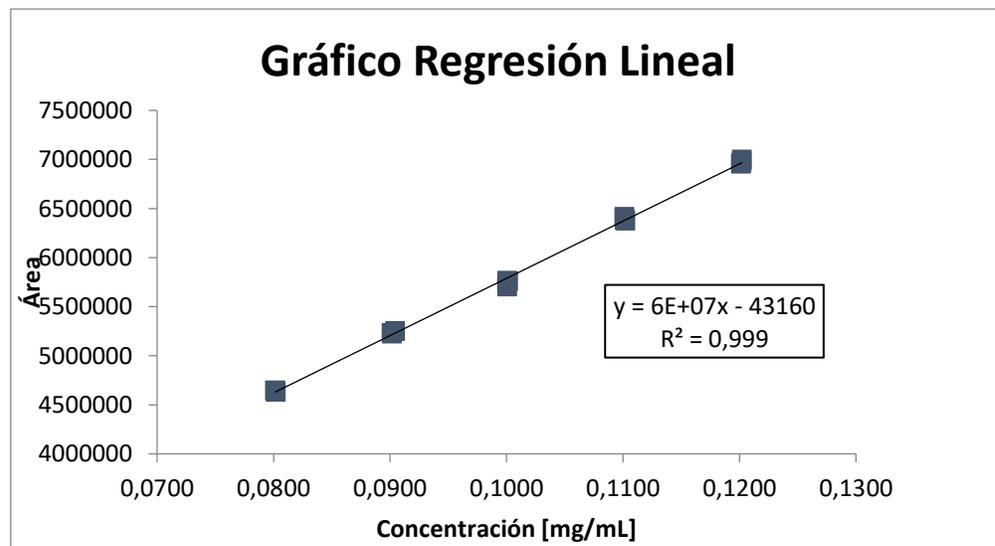


Figura N°2: Gráfico regresión lineal

En la tabla N° 13 se muestran los resultados de la regresión lineal.

Parámetro	Resultado Nifedipino
Ecuación de la recta	$y = 6E+07x - 43160$
Coefficiente de correlación (r)	0,999
Coefficiente de determinación (r ²)	0,999

Tabla N° 13: Resultados regresión lineal

Según los resultados obtenidos que se muestran en la tabla N° 13, “ $Y=b*x+a$ es la ecuación de la recta, donde x es la concentración, y la respuesta, b el valor de la pendiente y, a el termino independiente” (A.E.F.I., 2001 (p. 61). Un valor alto de la pendiente indica una mejor respuesta del método frente a cambios en la concentración del analito, en este caso se obtuvo una pendiente alta con un valor de 6E+07.

“El coeficiente de correlación indica el grado de relación entre la concentración (variable x) y la respuesta (variable y). Si el valor es cercano a la unidad significa que existe correlación con probabilidad elevada” (A.E.F.I., 2001 (p. 61). El coeficiente de correlación obtenido en este análisis es de 0,999, un valor muy cercano al 1 lo que indicaría linealidad en los datos obtenidos.

El coeficiente de correlación no justifica por si sola la linealidad, siendo “el coeficiente de determinación el que aporta una mayor significancia, ya que expresa la proporción de la variación total de y. Si el valor es cercano a la unidad

significa que existe correlación con probabilidad elevada” (A.E.F.I., 2001 (p. 61). El valor de determinación obtenido es de 0,999, resultado que junto al coeficiente de correlación confirmaría la linealidad de los datos.

Al representar los residuales en el eje de las ordenadas y los valores estimados en el eje de las abscisas como se muestra en la Figura N°3, “la distribución de los puntos debe ser aleatoria y no reflejar ninguna tendencia” (A.E.F.I., 2001 (p. 61).

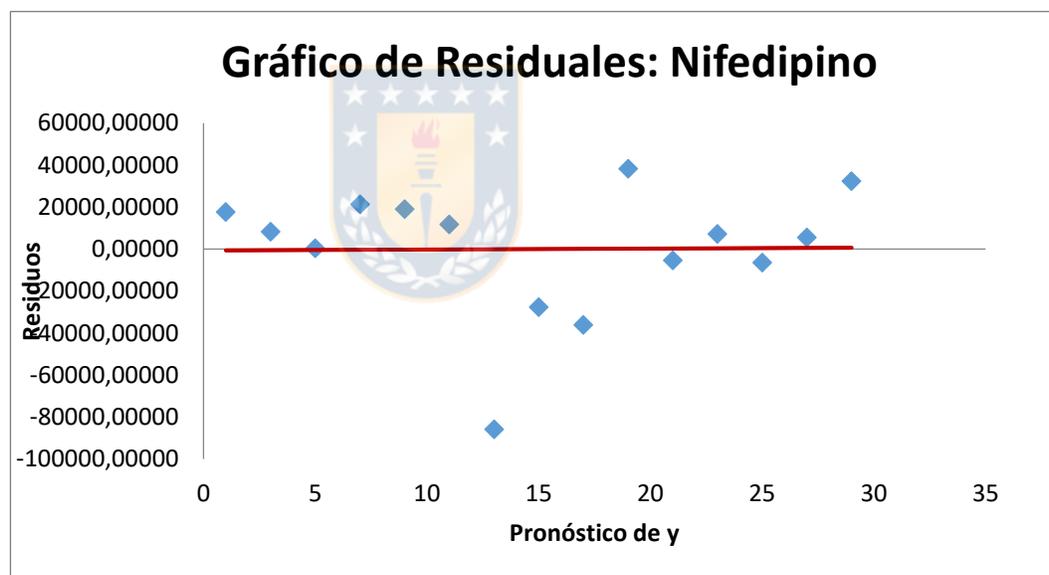


Figura N° 3: Gráfico residuales

En la figura N°3, se demuestra que los datos graficados no siguen ningún patrón y que su distribución es aleatoria.

Para probar si existe una correlación significativa, se realizó una prueba de t de Student con n-2 grados de libertad y un 95% de confianza, con “la hipótesis nula

de que no existe correlación entre x e Y. Si el valor de t experimental es mayor que el t de tabla, se rechaza la hipótesis nula, siendo significativa la correlación lineal” (Instituto de Salud Pública, 2010 (p.29)

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla N° 14.

Parámetro	T tabla	T experimental
$T_{exp} > T_{tabla}$	2,160	47,673

Tabla N° 14: Resultados t Student linealidad

El t experimental es mayor al t de tabla por lo que se rechaza la hipótesis nula, siendo significativa la correlación lineal.

Para poder realizar un test de ANOVA y así analizar las varianzas se debe cumplir con la homogeneidad de varianzas, calculado a través del test de Cochran. “El factor de Cochran indicará si el factor de concentración tiene influencia en la variabilidad de los resultados” (A.E.F.I., 2001 (p. 61). Si G experimental es menor al G de tabla, el factor concentración no tiene influencia significativa sobre la variabilidad de los resultados.

El G tabulado se calcula con 95% de confianza, con 5 grupos y n-1 determinaciones por grupo, los resultados se muestran en la Tabla N° 15.

Parámetro	G tabla	G experimental
$G_{exp} < G_{tabla}$	0,6838	0,5414

Tabla N° 15: Homogeneidad de varianzas linealidad

El G experimental calculado es menor al G de tabla demostrando que el factor concentración no tiene influencia sobre la variabilidad de los resultados.

Luego se realizó el análisis de varianza por ANOVA, un “F experimental mayor al F de tabla, demuestra la existencia de una pendiente distinta de cero” (A.E.F.I., 2001 (p. 62)

F tabulado se obtiene de acuerdo a los grados de libertad correspondientes y a un grado de significación igual a 0,05.

Los resultados se muestran en la tabla N° 16 y N° 17.

	Suma de Cuadrados (SC)	Grados de Libertad (GL)	Varianza (V)	F
Regresión	10186360361081	1	10186360361081	9848,374
Residuos	13446147637	13	1034319049	
Totales	10199806508717	14	728557607766	

Tabla N° 16: Cálculos de ANOVA linealidad

Parámetro	F tabla	F experimental
Ftabla < Fexp	4,667	9848,374

Tabla N° 17: Resultados ANOVA linealidad

Los resultados que se muestran en la Tabla N° 17, muestran que el F experimental es mayor al F tabulado, demostrando que la pendiente es distinta de cero.

“El factor de respuesta expresa la relación entre la respuesta y la concentración. En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente” (A.E.F.I., 2001 (p. 62), los resultados obtenidos se muestran en la tabla N° 18

Parámetro	Nifedipino
RSD	0,53%

Tabla N° 18: Resultados factor de respuesta linealidad

El RSD obtenido es menor a 2,00%, demostrando que los factores de respuestas son semejantes entre sí, demostrando linealidad de los resultados.



4.4. Exactitud

En la Tabla N°19, se pueden observar los resultados obtenidos a partir de las soluciones preparadas en los diversos niveles de concentración.

[%]	N° MP	Peso Materia Prima [mg]	Con. [mg/mL]	Área	Área Promedio	Recobro (%)	Varianza	Desviación Recobro	Promedio Recobro (%)	RSD recobro (%)
80	M1	336,6	0,080	4645923	4647692,5	99,90	1,86E-08	0,60	99,51	0,61
				4649462						
	M2	336,7	0,080	4640781	4639744,0	99,70				
				4638707						
	M3	336,7	0,080	4630705	4631863,5	99,53				
				4633022						
100	M1	420,2	0,100	5705152	5704840,0	98,23	3,19E-07			
				5704528						
	M2	420,2	0,100	5762614	5762988,0	99,23				
				5763362						

120	M3	420,6	0,100	5760822	5760175,0	99,08	1,52E-07
				5759528			
	M1	504,5	0,120	6954571	6954588,5	99,73	
				6954606			
	M2	504,7	0,120	6968927	6969465,0	99,91	
				6970003			
	M3	504,9	0,120	6995409	6998994,0	100,29	
				7002579			

Tabla N° 19: Resultados exactitud

Para determinar si el factor concentración tiene alguna influencia en los resultados se utiliza el test de Cochran, para ver la igualdad de varianzas.

“Al ser G experimental menor a G tabla significa que las variancias de los tres niveles de concentración utilizados son equivalentes, es decir que el factor concentración no influye en la variabilidad del resultado” (A.E.F.I., 2001 (p. 80).

El G tabulado se calculó con 95% de confianza, con 3 grupos y n-1 determinaciones por grupo.

Los resultados se muestran en la tabla N° 20, el G experimental es menor que G de tabla demostrando que el factor concentración no tiene influencia sobre la variabilidad de los resultados.

Parámetro	G tabla	G experimental
Gexp < Gtabla	0,8709	0,6521

Tabla N° 20: Homogeneidad de varianzas exactitud

El recobro es expresado como porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida de analito añadida sobre la muestra. (A.E.F.I., 2001 (p. 80)

El recobro de la muestra fue de un 99,51%, cumpliendo con los criterios de aceptación.

Para comprobar que la recuperación es satisfactoria se debe evaluar si hay diferencia significativa entre la recuperación media y el valor del 100%. Se realiza t de Student, con n-1 grados de libertad y un 95% de confianza, si T_{exp} es menor a T_{tabla} , no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100%.

Los resultados se muestran en la tabla N° 21.



Parámetro	T tabla	T experimental
$T_{exp} < T_{tabla}$	2,3060	0,2699

Tabla N° 21: Homogeneidad de varianzas recobro

En la tabla N°21 se muestra que el T experimental es menor al T de tabla, demostrando que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100%.

4.5. Precisión

4.5.1. Repetibilidad del sistema

“Este parámetro estudia la variabilidad debida únicamente al instrumento.” (A.E.F.I., 2001 (p. 69). La estimación de la repetibilidad del sistema se realiza con el cálculo del coeficiente de variación de las respuestas obtenidas. (A.E.F.I., 2001 (p. 70)

Los resultados se expresan en la tabla N° 22.

Área	Conc. Teórica [mg/mL]	Conc. encontrada [mg/mL]	Recobro (%)	Recobro Promedio (%)	Desviación Estándar (S)	RSD recobro (%)
5856518	0,101	0,103	101,49	101,48	0,039	0,04
5855368	0,101	0,103	101,47			
5857895	0,101	0,103	101,51			
5855453	0,101	0,103	101,47			
5852535	0,101	0,103	101,42			
5858903	0,101	0,103	101,53			

Tabla N° 22: Resultados repetibilidad del sistema

El RSD del recobro obtenido es de 0,04, cumpliendo con el criterio de aceptación de $\leq 2,00\%$, demostrando que el sistema presenta poca variabilidad.

4.5.2. Repetibilidad del método

La preparación de las muestras y las respuestas de estas, se detallan en la Tabla N° 19 (sección 4.4).

La estimación de la repetibilidad del método se realiza con el cálculo del coeficiente de variación de las respuestas obtenidas y el recobro. (A.E.F.I., 2001 (p. 71)

El RSD obtenido es de 0,61%, cumpliendo el criterio de aceptación demostrando que el método es repetible.



4.5.3. Precisión intermedia

La preparación y las respuestas para el analista uno se muestran en las tablas N°23 y 24, para el analista 2 se muestran en las tablas N° 25 y 26

Nivel [%]	N° Muestra	Peso Materia Prima [mg]	Área	Concentración teórica[mg/mL]	Concentración encontrada [mg/mL]	Recobro %
80	M1	336,0	4594169	0,080	0,080	99,47
	M2	336,7	4580386	0,080	0,079	98,97
	M3	336,3	4606064	0,080	0,080	99,64
100	M1	420,7	5712758	0,100	0,099	98,79
	M2	420,2	5714214	0,100	0,099	98,93
	M3	420,9	5448064	0,100	0,094	94,17
120	M1	504,3	6848715	0,120	0,119	98,80
	M2	504,4	6857264	0,120	0,119	98,90
	M3	504,5	6849094	0,120	0,119	98,77

Tabla N° 23: "Resultados analista 1 equipo 1"

Nivel [%]	N° Muestra	Peso Materia Prima [mg]	Área	Concentración teórica [mg/mL]	Concentración encontrada [mg/mL]	Recobro %
80	M1	336,0	4478027	0,080	0,080	99,38
	M2	336,7	4483217	0,080	0,080	99,29
	M3	336,3	4527106	0,080	0,080	100,38
100	M1	420,7	5633268	0,100	0,100	99,85
	M2	420,2	5598340	0,100	0,099	99,35
	M3	420,9	5350270	0,100	0,095	94,79
120	M1	504,3	6730689	0,120	0,119	99,53
	M2	504,4	6757861	0,120	0,120	99,91
	M3	504,5	6772921	0,120	0,120	100,11

Tabla N° 24: “Resultados analista 1 equipo 2”

Nivel [%]	N° Muestra	Peso Materia Prima [mg]	Área	Concentración teórica [mg/mL]	Concentración hallada [mg/mL]	Recobro %
80	M1	336,2	4595536	0,080	0,080	99,44
	M2	336,4	4604829	0,080	0,080	99,58
	M3	336,2	4587504	0,080	0,079	99,27
100	M1	420,1	5773020	0,100	0,100	99,97
	M2	420,1	5817504	0,100	0,101	100,74
	M3	420,1	5571848	0,100	0,097	96,49
120	M1	504,4	6861474	0,120	0,119	98,96
	M2	504,4	6813802	0,120	0,118	98,28
	M3	504	6772487	0,120	0,117	97,76

Tabla N° 25: “Resultados analista 2 equipo 1”

Nivel [%]	N° Muestra	Peso Materia Prima [mg]	Área	Concentración teórica [mg/mL]	Concentración hallada [mg/mL]	Recobro %
80	M1	336,2	4498734	0,0800	0,080	99,78
	M2	336,4	4483715	0,0801	0,080	99,39
	M3	336,2	4482664	0,0800	0,080	99,43
100	M1	420,1	5638836	0,1000	0,100	100,09
	M2	420,1	5675606	0,1000	0,101	100,74
	M3	420,1	5464686	0,1000	0,097	97,00
120	M1	504,4	6737234	0,1201	0,120	99,60
	M2	504,4	6701343	0,1201	0,119	99,07
	M3	504	6709532	0,1200	0,119	99,27

Tabla N° 26: “Resultados analista 2 equipo 2”

“La estimación de la precisión intermedia se realiza con el cálculo del coeficiente de variación de las respuestas obtenidas” (A.E.F.I., 2001 (p. 74) dando un 1,43% demostrando que los recobros obtenidos entre los dos analistas son semejantes.

Además, se calcula Anova para comprobar que las respuestas obtenidas no presentan diferencia significativa, dando un F experimental de 1,6E-05, siendo menor al F de tabla 2,606. Un “F experimental menor al F de tabla, demuestra que no hay diferencia significativa” (A.E.F.I., 2001 (p. 286). Demostrando que los recobros obtenidos son semejantes entre sí

4.6. Especificidad

En la solución muestra y la solución estándar se pudo detectar la presencia del pico correspondiente a Nifedipino con un tiempo de retención 11,7 minutos

aproximadamente, sin interferencia de otra especie química que dificultara su identificación. En cuanto a la solución solvente y el placebo, no se detectó alguna respuesta que pudiera interferir en la cuantificación e identificación del pico de Nifedipino.

Los cromatogramas se adjuntan en el Anexo N°2

Para el estudio de degradaciones forzadas, las respuestas y los recobros de cada muestra se detallan en la tabla N° 27.

ID Muestra	Concentración encontrada [mg/mL]	Recobro %	% Degradado
Condición Normal	0,102	101,53%	N/A
Termólisis	0,114	113,54%	11,83
Hidrólisis Ácida	0,101	100,72%	0,80
Hidrólisis Básica	0,010	99,77%	1,74
Oxidación	0,085	85,13%	16,15

Tabla N° 27: Resultado degradaciones forzadas

El porcentaje de degradación calculado según la fórmula de la sección 3.2.2.4.1 indica que Nifedipino se degrada bajo oxidación observando la formación de productos de degradación como se puede observar en el cromatograma correspondiente (Anexo N°2), además Nifedipino es sensible al calor, el recobro de la muestra junto a su respectivo cromatograma indica que existen productos

de degradación que aparecen junto al pico de Nifedipino al someter la muestra al calor, aumentando su área y por tanto su recobro.

4.7. Robustez

Los resultados fueron comparados con la expresión $S\sqrt{2}$, donde s es la desviación estándar obtenida por las áreas obtenidas en el ensayo de repetibilidad del método en el nivel 100% y del estándar. “Las diferencias superiores en valor absoluto al resultado de esta expresión ($S\sqrt{2}$) se consideran significativas” (A.E.F.I., 2001 (p. 104).

Los resultados para el estándar se muestran en la tabla N° 28 y para la muestra en la tabla N° 29

Solución estándar				
Cambio	Valor nominal X	Valor alternativo x	Diferencia $\Delta(X-x)$	$S \times \sqrt{2}$
Marca Columna	6500036,8	6780251,1	280214,3	8398,14
Temperatura columna	6647128,3	6633159,7	13968,6	
Flujo	5861950,0	7418337,9	1556387,9	
Volumen de inyección	6031003,2	7249284,8	1218281,6	
Longitud de onda	7250850,3	6029437,7	1221412,6	
Proporción Fase móvil	6577760,5	6702527,4	124766,9	
Filtro	6693238,8	6587049,2	106189,6	

Tabla N° 28: “Resultados estándar robustez”

Solución muestra				
Cambio	Valor nominal X	Valor alternativo x	Diferencia $\Delta(X-x)$	$S \times \sqrt{2}$
Marca Columna	6545025,8	6665431,0	120405,3	41482,63
Temperatura columna	6600125,5	6610331,3	10205,8	
Flujo	5838261,9	7372194,8	1533932,9	
Volumen de inyección	6003098,5	7207358,3	1204259,8	
Longitud de onda	7206294,6	6004162,2	1202132,4	
Proporción Fase móvil	6535928,7	6674528,1	138599,4	
Filtro	6661506,0	6548950,8	112555,3	

Tabla N° 29: “Resultados muestra robustez”

Al comparar la diferencia del valor nominal con el valor alternativo y la expresión $S\sqrt{2}$, se concluye que al método no se le puede hacer ningún cambio de los analizados ya que el estándar es sensible a todos los cambios realizados.

4.8. Estabilidad de soluciones

Los resultados de los análisis para la solución estándar se detallan en la tabla N° 30 y para la solución muestra en la tabla N° 31.

Solución estándar					
T°	Tiempo (Hrs)	Concentración Teórica [mg/mL]	Concentración encontrada [mg/mL]	Recobro (%)	Porcentaje de degradación (%)
Ambiente	0	0,102	0,102	99,86	N/A
	24	0,102	0,010	97,47	2,39
	48	N/A	N/A	N/A	N/A
	72	N/A	N/A	N/A	N/A
Refrigerado	0	0,102	0,102	99,90	0,03
	24	0,102	0,100	97,94	1,96
	48	0,102	0,099	96,84	3,06
	72	N/A	N/A	N/A	N/A

Tabla N° 30: “Resultados estabilidad para estándar”

Solución muestra					
T°	Tiempo (Hrs)	Concentración Teórica [mg/mL]	Concentración encontrada [mg/mL]	Recobro (%)	Porcentaje de degradación (%)
Ambiente	0	0,101	0,102	101,36	N/A
	24	0,101	0,100	99,24	2,12
	48	N/A	N/A	N/A	N/A
	72	N/A	N/A	N/A	N/A
Refrigerado	0	0,101	0,102	101,30	0,06
	24	0,101	0,100	99,46	1,84
	48	0,101	0,099	98,18	3,12
	72	N/A	N/A	N/A	N/A

Tabla N° 31: “Resultados estabilidad para muestra”

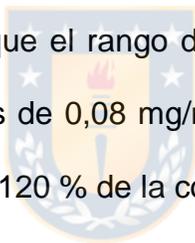
Tanto la solución estándar como la solución muestra de Nifedipino a temperatura ambiente (2-8°C) a las 24 horas mostraron un porcentaje de degradación mayor

al permitido, por lo que si se mantienen a temperatura ambiente deben ser inyectada una vez preparadas.

En cambio, si ambas soluciones se mantienen refrigeradas una vez preparadas su estabilidad se prolonga hasta 24 horas, pudiendo ser inyectadas hasta un día después de ser preparadas.

4.9. Rango

De los resultados obtenidos en los parámetros de validación, Precisión, Exactitud y Linealidad, se determina que el rango de concentración que cumple con los criterios de especificación es de 0,08 mg/mL a 0,12 mg/mL, comprendiendo el rango de porcentaje de 80 – 120 % de la concentración de trabajo del análisis.



5. CONCLUSIONES

Se elabora el protocolo de validación para la prueba de valoración del producto terminado de Nifedipino 20 mg comprimidos de liberación prolongada producido en ITF-Labomed, este documento fue elaborado sin desviaciones ni complicaciones, donde se detallan los análisis y parámetros a analizar.

De acuerdo a los parámetros y criterios establecidos en el protocolo de validación se procede a realizar el análisis cumpliéndose a cabalidad todos los análisis propuestos en el protocolo.

Al finalizar los análisis y realizar el tratamiento de datos, se comprobó que el método para el análisis es lineal, exacto y preciso en el rango de concentraciones de 0,08 mg/mL a 0,12 mg/mL. Además, que no existen señales de la matriz o del blanco que interfieran en su correcta identificación.

Las muestras analizadas, son sensible al calor y la oxidación y tanto la solución estándar y la solución muestra de Nifedipino deben ser inyectada una vez preparada si se deja a temperatura ambiente. Si se mantienen refrigeradas, las muestras son estables hasta las 24 horas. Además, el método se muestra sensible a los cambios realizados.

Finalmente se concluye, que el método analítico utilizado es adecuado con alto grado de confianza para realizar los análisis rutinarios de valoración en el producto terminado de Nifedipino fabricado por ITF-Labomed.



6. GLOSARIO

- Validación: Establecimiento de la evidencia documental que un procedimiento analítico conducirá con alto grado de seguridad a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y atributos de calidad previamente establecidos.
- Aptitud del sistema: Conjunto de ensayos que permiten comprobar en el momento de utilización del método que el sistema (analista, reactivos e o instrumento) es adecuado para llevar a cabo la determinación para la que se ha establecido y validado dicho método.
- Linealidad: Capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido.
- Exactitud: Expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como verdadero, valor nominal, teórico o un valor de referencia y el valor encontrado experimentalmente. Capacidad del método analítico para proporcionar resultados lo más cercanos posible al valor teórico o nominal.
- Robustez: Medida de la capacidad de un método analítico para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros proporcionando idea de su fiabilidad o estabilidad durante su empleo en rutina.
- Especificidad: Capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultánea o separadamente los analitos de interés de forma inequívoca sin interferencias de impurezas, productos de degradación, compuestos relacionados, excipientes u otras sustancias presentes en la matriz de la muestra.
- Precisión: Capacidad de un método para proporcionar resultados próximos entre sí.
- Repetibilidad: Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas, en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.
- Precisión intermedia: Evalúa la precisión del método frente a variaciones internas del laboratorio (analista, día, instrumento, etc). Es la precisión intralaboratorio.
- Estabilidad de soluciones: Es un requerimiento básico la demostración de la estabilidad de la muestra y de los patrones durante el tiempo comprendido entre su preparación y la finalización del análisis, especialmente cuando se ocupan equipos automáticos en donde las muestras pueden permanecer horas antes de ser analizadas.

- Rango: Diferencia en magnitud entre la mayor y menor concentración de analito que puede determinarse satisfactoriamente con adecuada linealidad, exactitud y precisión.



7. BIBLIOGRAFÍA

- A.E.F.I. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria) (2001). Validación de Métodos Analíticos. Madrid: A.E.F.I
- Chemicalize - Instant Cheminformatics Solutions. (2019). Nifedipine. [Internet] [Acceso 01/10/2019]. Disponible en: <https://chemicalize.com/#/calculation>.
- Instituto de Salud Pública (2010). Validación de Métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos" [Internet]. [Acceso 14/09/2019]. Disponible en: http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia%20T%C3%A9cnica%20de%20validaci%C3%B3n%20de%20M%C3%A9todos%20y%20determinaci%C3%B3n%20de%20la%20incertidumbre%20de%20la%20medici%C3%B3n_1.pdf
- Guzmán Riveros, Eduardo. Historia de una profesión: Colegio Químico Farmacéutico y Bioquímico de Chile A.G. 1942 - 60 años, 2002. [Acceso 11/01/2020]. Disponible en Memoria Chilena, Biblioteca Nacional de Chile <http://www.memoriachilena.gob.cl/602/w3-article-64013.html>.
- Reference.medscape.com. (2019). Procardia, Procardia XL (nifedipine) dosing, indications, interactions, adverse effects, and more. [Internet] [Acceso 01/10/2019]. Disponible en: <https://reference.medscape.com/drug/procardia-xl-nifedipine-342378#10>.
- Ramírez Labrada, Félix A, Plana Ramírez, Annia, Ferrandiz Ramírez, Dania, Ramírez, Ariel, & Ramírez Milán, Obdulia. (1999). La aspirina. El medicamento del siglo. Revista Archivo Médico de Camagüey, 3(3). [Acceso 07/11/2019]. Disponible en http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02551999000300011&lng=es&tlng=es. [Acceso 07/11/2019].
- United States Pharmacopeial Convention (2017). United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 41-NF 36). Rockville, MD.

8. ANEXOS

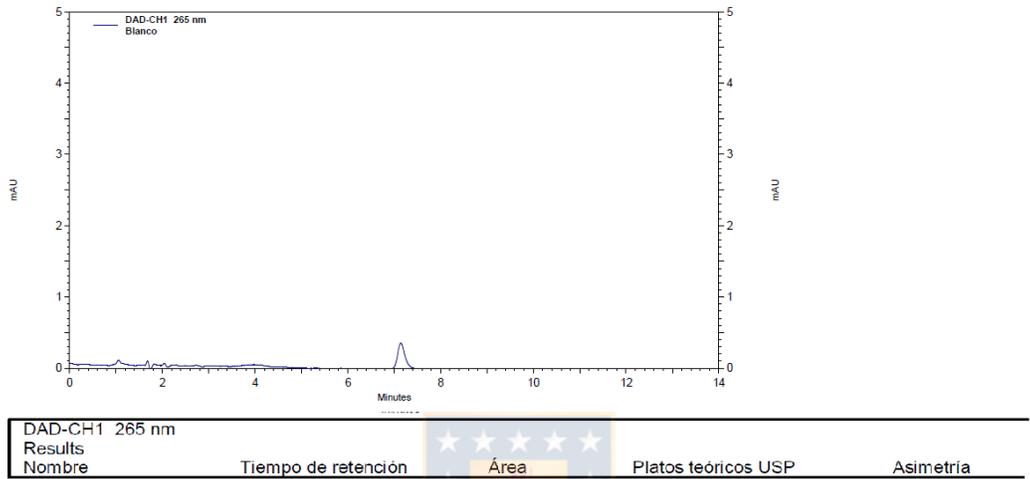
- Anexo N° 1: Portada protocolo validación metodología analítica

	PROTOCOLO VALIDACIÓN DE METODOLOGÍA ANALÍTICA	Código: PVM-004-VAL
	CARDICON® RETARD 20 MG COMPRIMIDOS LIBERACION PROLONGADA NIFEDIPINO 20 MG COMPRIMIDOS LIBERACION PROLONGADA	Versión: 01 Página: 1 de 18

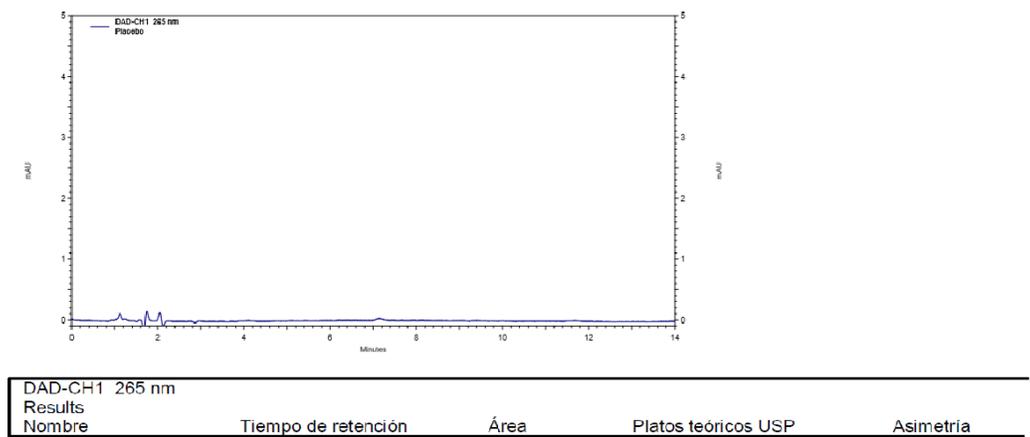
 PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE METODOLOGÍA ANALÍTICA	
<u>PRODUCTO</u>	: CARDICON® RETARD 20 MG COMPRIMIDOS LIBERACION PROLONGADA NIFEDIPINO 20 MG COMPRIMIDOS LIBERACION PROLONGADA
<u>PRUEBA</u>	: IDENTIDAD / VALORACIÓN / UNIFORMIDAD DE CONTENIDO
<u>TIPO DE VALIDACIÓN</u>	: VALIDACIÓN
<u>LABORATORIO</u>	: ITF-LABOMED

- Anexo N° 2: Cromatogramas especificidad

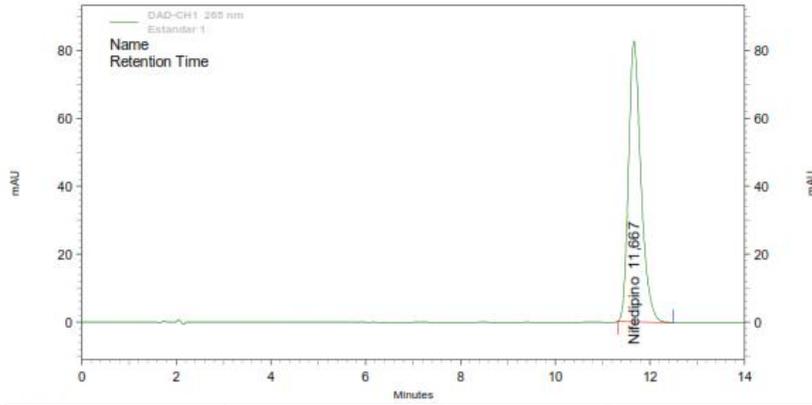
Cromatograma blanco



Cromatograma placebo



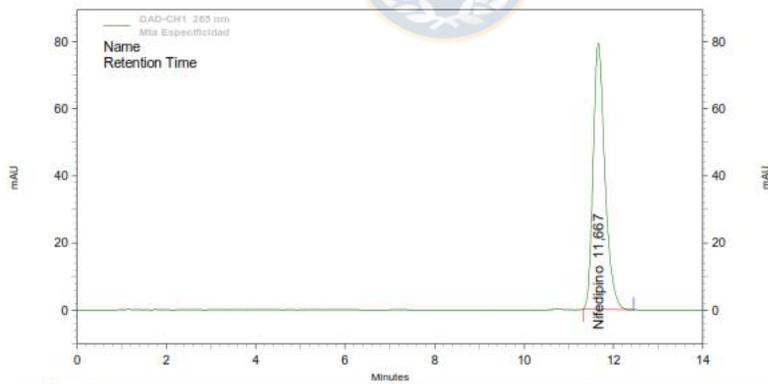
Cromatograma estándar



DAD-CH1 265 nm				
Results				
Nombre	Tiempo de retención	Área	Platos teóricos USP	Asimetría
Nifedipino	11,7	6025686	9578	1,3

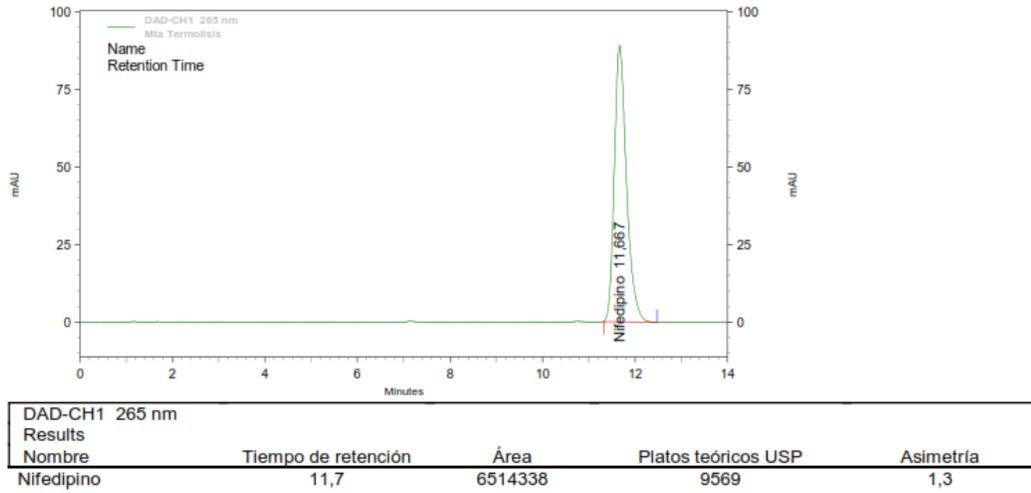


Cromatograma muestra

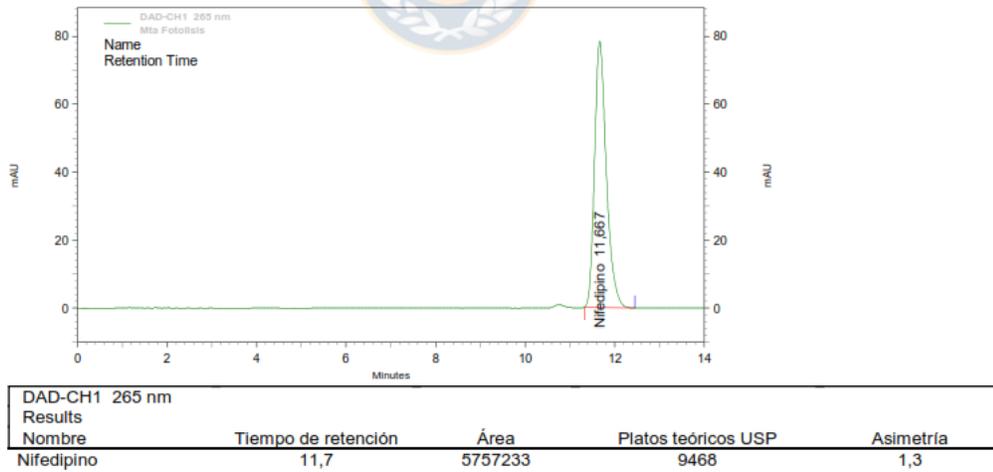


DAD-CH1 265 nm				
Results				
Nombre	Tiempo de retención	Área	Platos teóricos USP	Asimetría
Nifedipino	11,7	5820183	9452	1,3

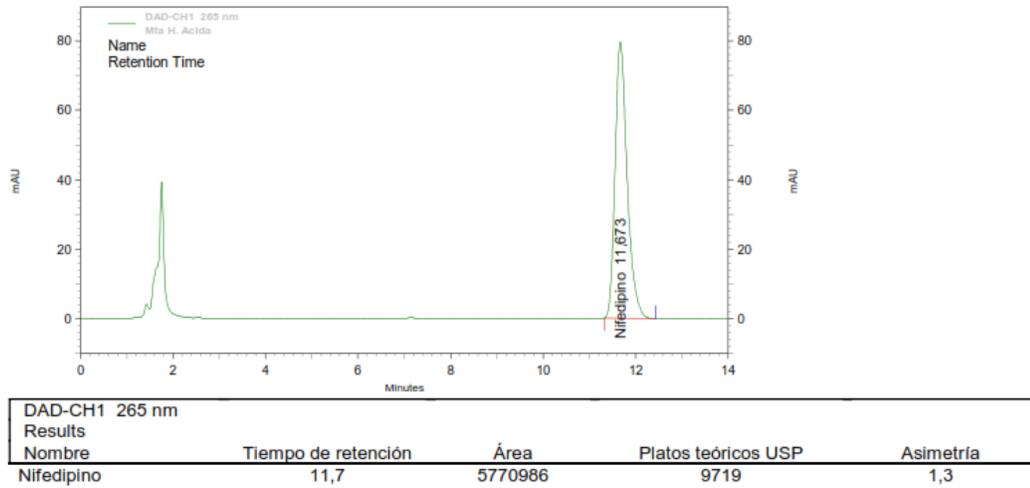
Cromatograma termólisis



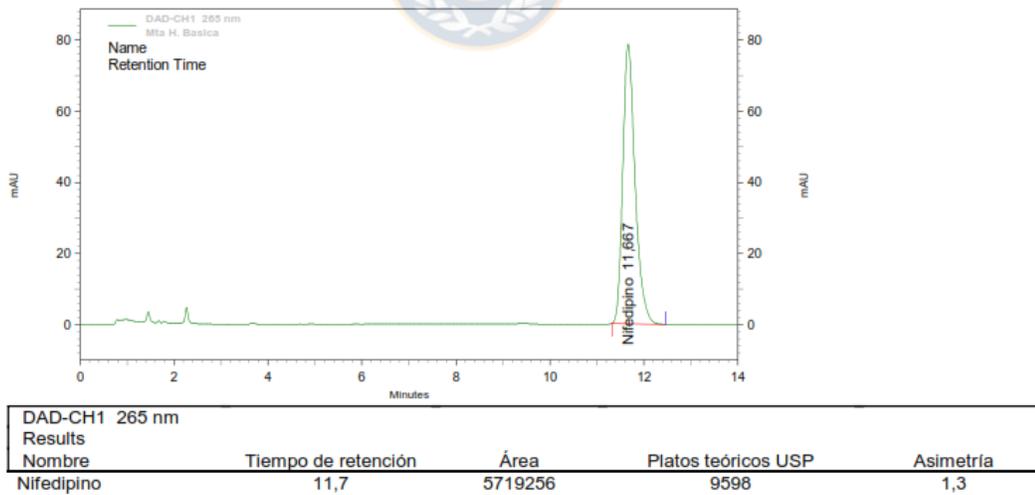
Cromatograma fotólisis



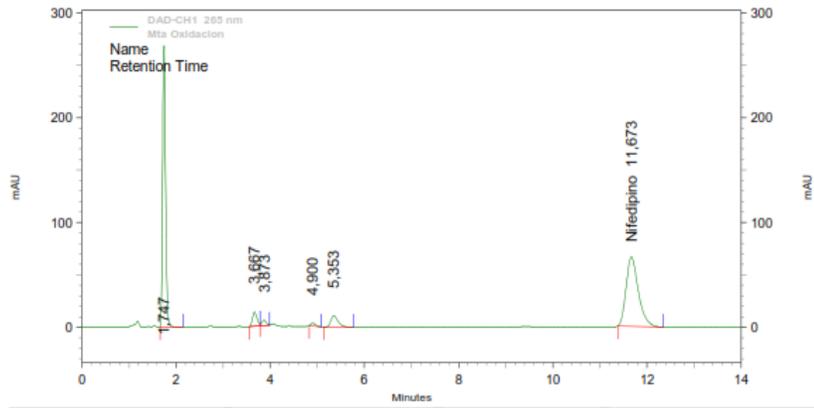
Cromatograma hidrólisis ácida



Cromatograma hidrólisis básica



Cromatograma oxidación



DAD-CH1 265 nm				
Results				
Nombre	Tiempo de retención	Área	Platos teóricos USP	Asimetría
	1,7	4670319	3617	1,2
	3,7	357196	6652	0,0
	3,9	127923	7185	0,0
	4,9	68819	11613	1,5
	5,4	445855	5927	1,4
Nifedipino	11,7	4785143	9609	1,3

