

88
de J.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**OPTIMIZACION Y VALIDACION DE UN METODO
ANALITICO PARA DETERMINAR CLORHIDRATO DE
VERAPAMILO EN 4 DIFERENTES FORMULACIONES
POR ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
SARA SUSANA MARTINEZ OLIVERA



MEXICO, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	Página
Introducción	i
Capítulo I: Generalidades	
A. Validación	2
B. Validación de métodos analíticos	7
C. Monografía del clorhidrato de verapamilo .	15
D. Espectroscopía de absorción	37
E. Cromatografía	45
Capítulo II: Metodología	
A. Equipo, instrumentos y material utilizado.	51
1. Espectrofotómetro y su calibración	
2. Balanza analítica y su calibración	
3. Agitador ultrasónico	
4. Material:	
a. de vidrio	
b. otros	
B. Reactivos, Soluciones y Sustancias de referencia	52
1. Metanol	
2. Acido clorhídrico 0.1 N	
3. Fase estacionaria	
4. Fase móvil	
5. Cloroformo	
6. Peróxido de hidrógeno al 30 %	
7. Clorhidrato de verapamilo	
8. Cloruro de hierro - Yodo.	
C. Optimización del método analítico	53
Técnica analítica	
D. Parámetros de validación	55
1. Linearidad del sistema	
2. Precisión del sistema	
3. Estabilidad de la muestra analítica	
4. Linearidad del método analítico	
5. Exactitud del método analítico	
6. Precisión del método analítico	
7. Especificidad del método analítico	
8. Tolerancia	

	Página
E. Cromatografía en capa fina	58
Capítulo III: Resultados	
A. Parámetros de validación	
Linearidad del sistema	61
Precisión del sistema	61
Estabilidad de la muestra analítica	63
Formulación I	
Linearidad del método	64
Exactitud del método	65
Precisión del método	65
Formulación II	
Linearidad del método	68
Exactitud del método	69
Precisión del método	69
Formulación III	
Linearidad del método	72
Exactitud del método	73
Precisión del método	73
Formulación IV	
Linearidad del método	76
Exactitud del método	77
Precisión del método	77
Especificidad del método analítico	80
Tolerancia del método analítico	91
B. Cromatografía en capa fina	92
Conclusiones	93
Bibliografía	94

I N T R O D U C C I O N

Para asegurar que en la determinación de uno o más principios activos presentes en una formulación, se realiza el procedimiento analítico adecuado, es esencial llevar a cabo una Validación de la técnica analítica y de esta manera se certifica la validez de los métodos de análisis empleados rutinariamente. Por tanto, la Validación es una medida del funcionamiento del sistema analítico total.

Mediante este trabajo de tesis se intenta responder a las siguientes preguntas:

- ¿Cómo optimizar un método analítico por espectrofotometría ultravioleta para determinar al clorhidrato de verapamilo en cuatro diferentes formulaciones? y
- ¿Cómo validarlo?

El método utiliza la espectrofotometría U.V. como técnica de análisis para determinar al principio activo de las cuatro formulaciones bajo las mismas condiciones de análisis, aprovechando la propiedad característica del clorhidrato de verapamilo de presentar un máximo de absorción en el intervalo de luz U.V. a una longitud de onda aproximada de 278 nm.

El objetivo del presente trabajo es modificar la técnica analítica para determinar al clorhidrato de verapamilo en cuatro diferentes formulaciones, con el fin de optimizarla y validarla.

La modificación a la metodología de análisis de la empresa fabricante permitirá obtener resultados con mayor rapidez, se utilizará una sola técnica analítica para determinar al principio activo empleando el mismo disolvente para los cuatro productos farmacéuticos en estudio. Además, se cuantificará el clorhidrato de verapamilo con mayor precisión y exactitud y se disminuirá la cantidad de disolvente empleado, lo cual

conducirá a una reduccción importante en el costo de análisis de cada formulación.

Una vez que el método haya sido optimizado, se llevará a cabo su validación, a fin de asegurar la validez de los resultados obtenidos en el control analítico de los medicamentos.

Las cuatro formulaciones en las que se determinará el clorhidrato de verapamilo son en grageas y en tabletas laqueadas.

FORMULACION	FORMA FARMACEUTICA	CLORHIDRATO DE VERAPAMILO (mg)
I	Tableta laqueada	180
II	Tableta laqueada	120
III	Gragea	80
IV	Gragea	40

También en este trabajo se utilizará la cromatografía en capa fina como técnica auxiliar en la determinación del principio activo en presencia de sustancias relacionadas debido a que el método de control de calidad no es específico.

C A P I T U L O I

G E N E R A L I D A D E S

A. VALIDACION.

El objetivo de la validación, es proporcionar los lineamientos básicos para establecer un programa, destinado a obtener productos que cumplan con las especificaciones y atributos de calidad preestablecidos. La finalidad de cualquier compañía que se precie de ser ética, es fabricar productos que cumplan exclusivamente con el propósito que pretenden y para el cual fueron creados⁽²⁴⁾.

1. Historia de la validación.

En Enero de 1985, las regulaciones de las GPM's de la FDA establecieron que los sistemas computarizados que estuvieran relacionados con la producción de medicamentos, tenían que ser validados. Sin embargo, la historia no empezó con este incidente, desde antes de 1976, el concepto de validación ya se había aplicado a los métodos analíticos y con la introducción de dichas regulaciones de GMP's de la FDA en ese año, comenzó la historia de la validación; la cual se resume en los cinco capítulos siguientes:

1976 - 1991:

- Capítulo I. Esterilización (1976-1979)
- Capítulo II. Procesos asépticos (1979-1987)
- Capítulo III. Procesos de tratamientos de agua (1981-1985)
- Capítulo IV. Procesos no asépticos (1983-1987)
- Capítulo V. Sistemas computarizados relacionados (1983-?).

Desde mediados de los 70's, la validación ha jugado un papel dominante en la producción y en el aseguramiento de calidad de los productos que estén relacionados con el cuidado de la salud. La aplicación de los principios de validación a cualquier proceso de manufactura, tuvo lugar a principios de los 80's cuando se reconoció la necesidad que había de validar los procesos de esterilización así como los procesos asépticos. A lo largo de esta década, las diferentes disciplinas como las correspondientes a regulaciones, las industriales, sectores de ventas, producción, control de calidad, aseguramiento de calidad, materiales, control de inventarios, ingeniería, programadores de software, etc., dieron sus puntos de

vista, reflejando así que había una inquietud general en todos los aspectos involucrados con la industria farmacéutica.

Con la propuesta de la FDA acerca de las buenas prácticas de manufactura (CGMP) empezó una nueva historia de la validación⁽⁶⁾.

Cronología.

1. 1906. Se creó la FDA (Food and Drug Act) - Prevenir adulteraciones.
2. 1938. Se creó la FD&C (Food, Drug and Cosmetic Act) - Probar la seguridad de los productos.
3. 1962. Kefauver-Harris Amendment - Probar la eficacia del producto.
4. 1976. CGMP - Escribir los procesos, aprobarlos, validar los sistemas y documentar todo. Validación de procesos de esterilización.
5. 1979. Validación general de procesos.
6. 1982. Se crearon las guías y normas para llevar a cabo las GMP's, así como la validación y afortunadamente en los últimos 16 años se ha visto una gran cooperación y un importante esfuerzo por todos los miembros del sector regulatorio, del sector industrial, académico y mas recientemente, el sector de ventas.
7. 1983. Validación para productos no estériles.
8. 1985. Todo proceso que no esté validado, se considera fuera de control^(6, 24).

La calidad no debe ser evaluada en los productos sino que debe construirse junto con ellos, de aquí surgió la PRIMERA DEFINICION DE VALIDACION dada por la FDA en 1977:

"Establecer evidencia documentada de que un sistema hace lo que tiene el propósito de hacer".

La Validación involucra muchos conceptos que son cubiertos por las GMP's. Por tanto, la FDA tuvo que redefinir el término. La SEGUNDA DEFINICION DE VALIDACION apareció en 1987:

" La validación es establecer evidencia documentada que proporcione un alto grado de seguridad, que un proceso específico producirá un producto que cumpla con las especificaciones y atributos de calidad predeterminados".

En 1983 con las "Guías para la inspección de sistemas computarizados usados en la fabricación de productos farmacéuticos" comúnmente conocidas como "Guía azul", comenzó la historia de su validación ya que los instrumentos computarizados, controles y sistemas software, han sido de gran ayuda en la industria farmacéutica.

La definición de Validación dada por Kenneth Chapman en 1985 es:

"En la industria farmacéutica de hoy, ya sea que se trate de un sistema computarizado, o uno de tratamiento de agua, o un proceso de manufactura, la validación no significa nada más allá de lo bien organizado, y de lo bien documentado"⁽⁶⁾.

2. Propósito de la validación.

El propósito de la validación es asegurar la elaboración de productos de alta calidad que cumplan con las características indicadas en sus etiquetas, que estén en conformidad con todos los estándares y especificaciones establecidas por la compañía y que cumplan con todos los requerimientos legales de los lugares donde se fabriquen y/o comercialicen.

En cuanto a costos, se incrementan los debidos al desarrollo, ya que se requiere capacitación del personal, así como personal adicional y además se necesita asesoría externa. Sin embargo, se obtienen beneficios tales como:

- Mejorar productividad
- Reducir costos en Producción y Control de Calidad
- Mejorar competitividad⁽²⁴⁾.

3. Tipos de validación.

PROSPECTIVA. Establecer evidencia documentada de que un determinado sistema hace lo que tiene el propósito de hacer, basado sobre un protocolo previamente elaborado.

RETROSPECTIVA. Establecer evidencia documentada de que un determinado sistema hace lo que tiene el propósito de hacer, basado en la revisión y análisis de su información histórica.

CONCURRENTE. Establecer evidencia documentada de que un determinado sistema hace lo que tiene el propósito de hacer, basado en la información durante la actual implementación del proceso⁽²⁴⁾.

4. Organización.

La validación en una compañía, funciona mediante un comité de validación coordinado por el departamento de validaciones e integrado por cada uno de los departamentos involucrados en la manufactura del producto.

En la figura A1 se muestran los departamentos que forman parte de un Comité de Validación.

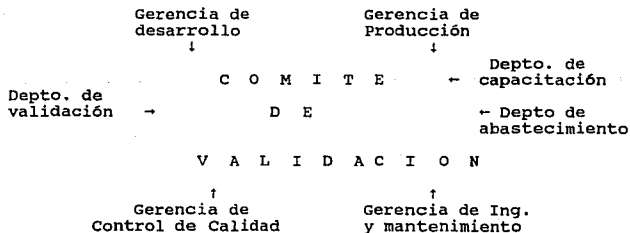


Figura A1. Departamentos que forman parte del Comité de Validación de una compañía.

5. Revalidación.

Una vez que el sistema ha sido validado, se considera que está bajo control y mientras no cambien ni las condiciones, ni los parámetros, el sistema continúa controlado.

Actualmente, existen sistemas formales de control de los cambios que se presentan en un sistema ya validado, en el cual representantes calificados de cada una de las disciplinas involucradas, revisan los cambios actuales o los propuestos que pudieran afectar al sistema y si fuera necesario, tomar una acción correctiva para asegurar que el sistema permanece en su estado validado de control.

La revalidación, es la repetición del proceso de validación o de una parte específica de éste. En algunos casos, las compañías encuentran apropiado revalidar periódicamente ciertos sistemas aún cuando no se crea que han ocurrido cambios. Es conveniente tener la certificación de la revalidación, ya que es un testimonio documentado por autoridades calificadas de que la calificación de un sistema, calibración, validación, o la revalidación se han llevado a cabo adecuadamente y los resultados obtenidos son aceptables^(8, 14).

B. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.

La calidad de un método analítico tiene que ser caracterizada, monitoreada, evaluada y validada. La naturaleza de los métodos analíticos puede ser física, química, microbiológica, biológica o una combinación de estos tipos. La calidad del análisis es construida durante su etapa de diseño, validada en su etapa de desarrollo y confirmada en su etapa de utilización⁽¹⁶⁾.

Por lo anterior, la validación del método analítico es una parte integral del desarrollo del mismo. El método debe probarse para determinar su efectividad. La validación generalmente incluye una evaluación de la precisión, linealidad, exactitud y especificidad, y proporciona una medida del comportamiento del método.

La validación de un método analítico se define como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

La capacidad se expresa en términos de parámetros analíticos.

El factor más importante durante la validación de cualquier método analítico, es siempre el criterio del analista, el cual es necesario aplicar después de tomar en cuenta todos los factores relacionados, con el o los principios activos, concentraciones, forma farmacéutica, tipo de muestra, método de análisis, propósito de la técnica analítica, instrumentación, sustancias relacionadas, etc.⁽³⁾

Durante la validación se trabaja inicialmente con el principio activo, para determinar si el método lo detecta adecuadamente, enseguida se cuantifica el principio activo en placebos adicionados, y finalmente se analiza el producto terminado, en donde se evalúa si el procedimiento de manufactura afecta la cuantificación del principio activo. El criterio de aceptación dependerá de la complejidad del método analítico.

La validación se enfoca a conocer el error de los métodos analíticos y si ese error es menor que el establecido, la técnica se considera validada y adecuada.

Actualmente, la validación del método analítico es una parte integral del desarrollo de un medicamento por lo que no es posible considerarlos por separado.

Los resultados parciales o finales de la validación pueden dar como conclusión que:

1. El método es confiable y por consiguiente se considera validado.
2. Requiere modificaciones y una vez llevadas a cabo, iniciar o completar la validación.
3. El método no es confiable para cuantificar a la sustancia problema, por lo tanto es necesario desarrollar una nueva técnica e iniciar la validación⁽¹⁹⁾.

1. Seguimiento para la validación de técnicas analíticas.

- a. Cronograma de realización
- b. Designación del personal responsable
- c. Procedimientos analíticos escritos
- d. Estándares primarios de referencia
- e. Instrumentos y materiales calibrados
- f. Descripción del plan de validación
- g. Definición de criterios de aceptación para cada parámetro evaluado (dependiendo del método).
- h. Aprobación⁽²⁴⁾.

2. Definiciones de los parámetros analíticos.

Linealidad. La linealidad de un sistema o de un método analítico, es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, que pueden obtenerse directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

Intervalo. El intervalo de un método analítico, está definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles de concentración superior e inferior de la sustancia, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

Exactitud. La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de

recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

Precisión. La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Se expresa en términos de Desviación Estándar o del Coeficiente de Variación. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

a. **Repetibilidad.** Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.).

b. **Reproducibilidad.** Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos, etc.).

Límite de detección. Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

Límite de cuantificación. Es la menor concentración de una sustancia que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.

Especificidad. Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

Tolerancia. La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, condiciones ambientales, etc.

Estabilidad de la muestra. Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas^(3, 4).

3. Parámetros a evaluar para un Método Indicador de Control de Calidad.

En la tabla B1 se muestran los parámetros que deben evaluarse cuando se trata de un Método Indicador de Control de Calidad⁽³⁾.

Tabla B1

Parámetro		Revalidación del método	
		Sin cambio*	Con cambio*
Linealidad y precisión del sistema	X	X	X
Límite de detección			
Límite de cuantificación			
Exactitud y repetibilidad al 100 %	X	X	X
Linealidad del método	X	X	X
Precisión (Reproducibilidad)	X		X
Especificidad (Control de calidad)	X	X	X
Especificidad (Estabilidad)			
Tolerancia del sistema			X
Estabilidad de la muestra analítica	X	X	X

* En las condiciones de operación.

4. Glosario.

b = Ordenada al origen.

r = Coeficiente de correlación.

r² = Coeficiente de determinación.

CV = Coeficiente de variación.

IC = Intervalo de confianza al 95 %.

m = Pendiente de la recta.

R = Porcentaje recuperado.

\bar{R} = Promedio aritmético del porcentaje recuperado.

F = Valor de la distribución F de Fisher con una probabilidad acumulada de 0.975.

I = Factor para cálculos en la Estabilidad de la muestra.

gl = Grados de libertad⁽³⁾.

5. Determinaciones de los parámetros analíticos para Método Indicador de Control de Calidad.

Linealidad del Sistema.

Se determina, construyendo una curva de calibración, utilizando cuando menos cinco diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo análisis cuando menos por duplicado para cada dilución.

El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método; para control de calidad y de seguimiento de la estabilidad de un fármaco en una forma farmacéutica, deberá estar incluida la concentración seleccionada como 100 %.

Criterio de aceptación:

$$\begin{aligned} CV &\leq 1.5 \% \\ r &\geq 0.99 \end{aligned}$$

$$r^2 \geq 0.98$$
$$b \approx 0$$

Precisión del Sistema.

Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100 % establecido en la linealidad del sistema.

Criterio de aceptación:

$$CV \leq 1.5 \%$$

Linealidad del Método.

Se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos 3 diferentes cantidades de la sustancia de interés, (placebos cargados), cada uno de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado. Las concentraciones de los placebos cargados deben ser las adecuadas para que, utilizando el método propuesto, las concentraciones de las soluciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la linealidad del sistema, incluyendo siempre la correspondiente al 100 %.

La amplitud del estudio dependerá del uso y aplicaciones del método y deberá llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

Criterio de aceptación:

Cantidad adicionada vs. cantidad recuperada:

$$m \approx 1$$
$$b \approx 0$$
$$r \geq 0.99$$
$$r^2 \geq 0.98$$

El porcentaje recuperado (\bar{R}) y el CV deben estar de acuerdo con la tabla B2.

Exactitud al 100 %.

Se determina de cuando menos, 6 placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100%, utilizando el método propuesto. haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

Criterio de aceptación:

El \bar{R} y el CV deberán estar de acuerdo con la tabla B2⁽³⁾.

Tabla B2

Método	\bar{R}	CV
Cromatográficos	98 - 102 %	≤ 2 %
Titrimétricos	98 - 102 %	≤ 2 %
Químicos y Espectrofotométricos	97 - 103 %	≤ 3 %
Microbiológicos	95 - 105 %	≤ 5 %

Precisión (Reproducibilidad).

Se determina de una muestra homogénea del producto cercana al 100 % de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado.

Criterio de aceptación:

El CV debe cumplir con lo siguiente:

Método	CV
Cromatográfico	≤ 2 %
Químico y espectrofotométrico	≤ 3 %
Microbiológicos	≤ 5 %

Especificidad para Métodos de Control de Calidad.

Con el método propuesto:

1. Analizar placebos del producto.
2. Identificar la(s) respuesta(s) del(los) activo(s), y si procede, de los excipientes y/o de otras sustancias presentes.

Criterio de aceptación:

Confirmar que el método desarrollado es capaz de cuantificar la sustancia de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes.

Estabilidad de la muestra analítica.

Se determina mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de 3 muestras con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones.

La determinación debe ser efectuada por el mismo analista.

Criterio de aceptación:

La muestra es estable, si el IC para la diferencia de la media de la muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero y/o la magnitud del efecto no exceda los siguientes porcentajes^(3, 4, 20):

Cromatográficos	± 2 %
Titrimétricos	± 2 %
Químicos y espectrofotométricos	± 3 %
Microbiológicos	± 5 %

C. MONOGRAFIA DEL CLORHIDRATO DE VERAPAMILLO.

1. Descripción.

a. Nombre químico.

5-[(3,4-dimetoxifenil)metil-amino]-2-(3,4-dimetoxifenil)-2-isopropil valeronitrilo clorhidrato.

α -[3-[[2-(3,4-dimetoxifenil)etil]-metilamino]propil]-3,4-dimetoxi- α -(1-metil etil)benzeno-acetonitrilo clorhidrato.

Clorhidrato de 5-[N-(3,4-dimetoxifenil)-N-metilamino]-2-(3,4-dimetoxifenil)-2-isopropilvaleronitrilo^(11, 12).

b. Nombre genérico.

Verapamilo.

Clorhidrato de verapamilo⁽¹²⁾.

c. Nombre comercial.

Calan

Isoptin

Vibeline

Carduben

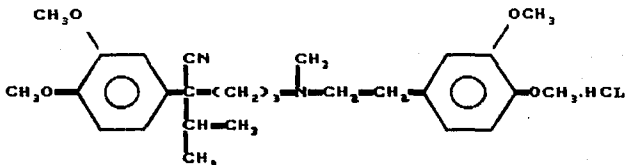
Cordilox

Vasolan

Visnadine^(12, 17, 18)

d. Fórmula y peso molecular.

Desarrollada:



M:491.07

Condensada:

$C_{27}H_{39}ClN_2O_4$

e. Apariencia, color y olor.

Polvo blanco cristalino, sin olor discernible^(11,12,18).

2. Propiedades físicas.

a. Espectro Infrarrojo.

El espectro infrarrojo del clorhidrato de verapamilo se muestra en la figura C1.

La longitud de onda y la asignación a las principales bandas de absorción se presenta en la tabla C1⁽¹²⁾.

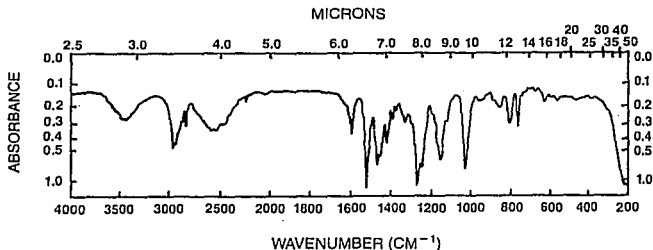


Figura C1. Espectro Infrarrojo del clorhidrato de verapamilo (pastilla de KBr).

Tabla C1

Longitud de onda (1/cm)	Banda de absorción debida a las vibraciones de tensión.
Entre 3030 y 2860	C-H de grupos metilo y metileno.
2840	C-H de grupos metoxi.
Entre 2800 y 2300	N-H de la amina protonada.
2236	C-N del alquil nitrilo saturado.
1607, 1591 y 1518	C=C aromáticos de núcleos bencénicos sustituidos.
1262	C-O de los éteres aromáticos.

b. Espectro Raman.

El espectro Raman fué obtenido en estado sólido. Se muestra en la figura C2.

La interpretación del espectro Raman se presenta en la tabla C2⁽¹²⁾.

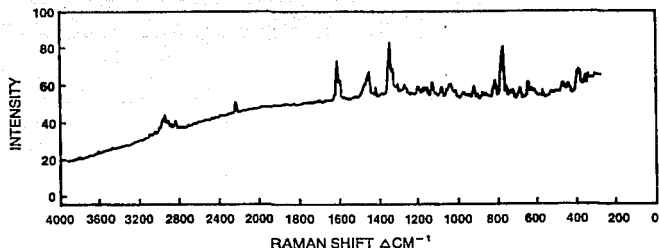


Figura C2. Espectro Raman del clorhidrato de verapamilo.

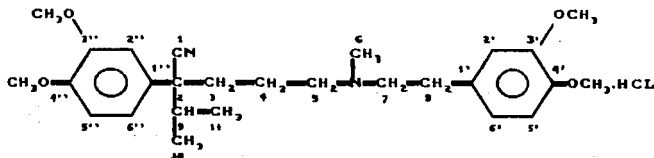
Tabla C2

Longitud de onda (1/cm)	Banda de absorción debida a las vibraciones de tensión.
Entre 3020 y 2860	C-H de los grupos metilo y metileno.
2840	C-H de los grupos metoxi.
2236	C-N del alquil nitrilo saturado.
1611	C=C aromáticos de núcleos bencénicos sustituidos.
775	Benceno 1,2,4-tri-sustituido.

c. Espectro de RMN protónica.

El espectro de RMN protónica del clorhidrato de verapamilo obtenido en una solución al 10 % (P/V) utilizando como disolvente metanol deuterado, se presenta en la figura C3.

Los picos espectrales asignados se muestran en la tabla C3, y corresponden a la siguiente estructura⁽¹²⁾:



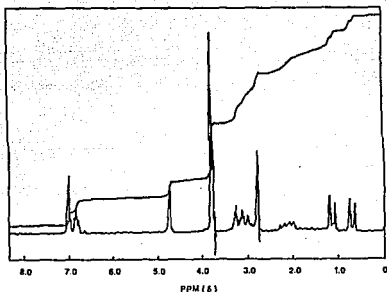


Figura C3. Espectro de RMN protónica del clorhidrato de verapamilo en metanol deuterado.

Tabla C3
Asignación espectral para PMR.

Asignación del protón	Cambio químico (ppm)	Multiplicidad
2'-H	6.66-7.15	Multiplete
5'-H		
6'-H		
2''-H		
5''-H		
6''-H	3.83	Singulete
O-CH ₃		
O-CH ₃		
O-CH ₃	3.86	Singulete
O-CH ₃	3.81	Singulete
5-CH ₂	2.75-3.40	Multiplete
7-CH ₂		
8-CH ₂		
N-CH ₃	2.82	Singulete
9-CH	1.26-2.45	Multiplete ancho
3-CH ₂		
4-CH ₂		
10-CH ₃	1.22	Doblete
11-CH ₃	0.7	Doblete

d. Espectro de RMN C-13.

El espectro de RMN C-13 del clorhidrato de verapamilo en una solución al 20 % (P/V) empleando metanol deuterado como disolvente, se muestra en la figura C4. La interpretación del espectro se presenta en la tabla C4 (12).

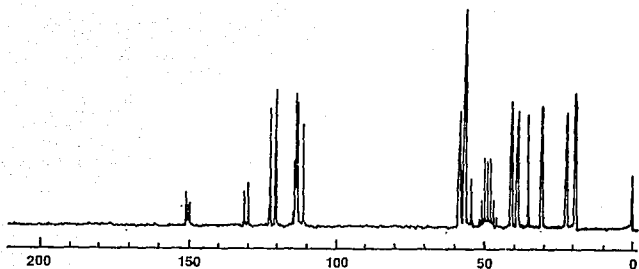


Figura C4. Espectro de RMN C-13 del clorhidrato de verapamilo. El multiplete a 49 ppm es debido al solvente usado CD_3OD .

Tabla C4
Asignación espectral CMR.

Asignación del carbono	Cambio químico (ppm)	Multiplicidad ORSFD*
C-3'	151.0	Singulete
C-3''	150.9	Singulete
C-4'	150.4	Singulete
C-4''	149.8	Singulete
C-1'	131.3	Singulete
C-1''	130.1	Singulete
C-1	122.2	Singulete
C-6'	122.2	Doblete
C-6''	120.5	Doblete
C-5'	113.9	Doblete
C-5''	113.6	Doblete
C-2'	113.1	Doblete
C-2''	111.3	Doblete
C-7	58.1	Triplete
C-5	56.9	Triplete
O-CH ₃ ×4	56.6	Cuarteto
C-2	54.6	Singulete
C-6	40.7	Cuarteto
C-9	38.6	Doblete
C-8	35.4	Triplete
C-3	30.6	Triplete
C-4	22.0	Triplete
C-10	19.3	Cuarteto
C-11	19.0	Cuarteto

* Off Resonance Single Frequency Decouplin experiment.

e. Espectro de masas.

El espectro de masas del clorhidrato de verapamilo se muestra en la figura C5⁽¹²⁾.

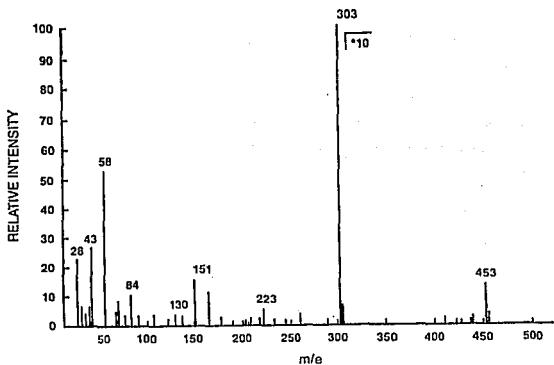


Figura C5. Espectro de masas de alta resolución del clorhidrato de verapamilo.

Tabla C5

Masa medida (m/e)	Masa calculada	Fórmula
453.2767	345.2753	$C_{27}H_{37}N_2O_4$
303.2080	303.2073	$C_{18}H_{27}N_2O_2$
151.0759	151.0759	$C_9H_{11}O_2$

f. Espectro ultravioleta.

El espectro U.V. en una solución al 0.002 % en metanol se muestra en la figura C6, presentando dos máximos de

absorción, uno a una longitud de onda de 230 nm ($\epsilon=16700$) y el otro a 278 nm ($\epsilon=6090$)^(12, 18).

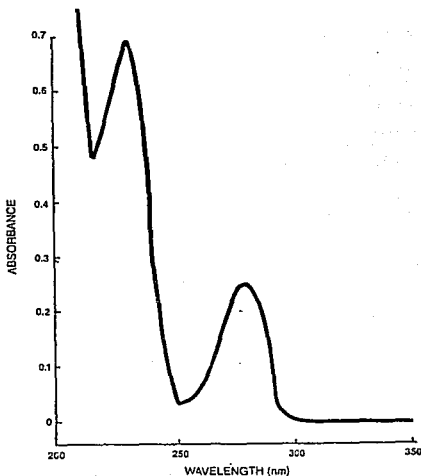


Figura C6. Espectro ultravioleta del clorhidrato de verapamilo en una solución al 0.002% en metanol.

g. Espectro de fluorescencia.

El clorhidrato de verapamilo exhibe fluorescencia cuando se excita con luz U.V. presentando un máximo de emisión a 365 nm. El espectro obtenido en una solución al 0.005% en metanol, cuando se usaron longitudes de onda de excitación de 236 y 276 nm, las cuales corresponden al máximo del espectro de absorción, se presenta en la figura C7.

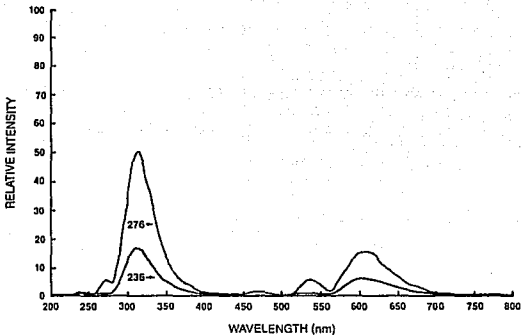
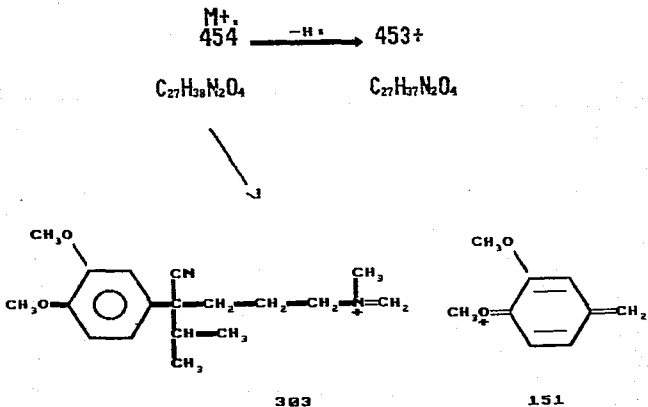


Figura C7. Espectro de emisión del clorhidrato de verapamilo. Excitación a 236 y a 276 nm.

La vía de fragmentación es la siguiente⁽¹²⁾:



h. Solubilidad.

La solubilidad del clorhidrato de verapamilo es función del pH y es de 80 - 90 mg/ml de pH 2.3 - 6.4, en dónde las especies ionizadas predominan, luego disminuye rápidamente a pH mayores. La solubilidad de la forma base es de 0.025 mg/ml en NaOH 0.1 N.

En la tabla C7, se muestra la solubilidad en agua a diferente pH (soluciones a 25°C) y en la tabla C8, en diferentes disolventes (a temperatura ambiente)⁽¹²⁾.

Tabla C7

pH	Solubilidad (mg/ml)
2.32	82.0
3.05	78.0
4.65	89.0
4.86	82.0
5.59	76.0
6.35	83.0
6.54	46.0
6.59	29.0
6.76	11.0
7.32	0.44
8.09	0.17
8.87	0.062
NaOH 0.1N pH 12.6	0.025

El pH se ajusta con HCl 0.1 N y con NaOH 0.1N.

Tabla C8

Solvente	Solubilidad (mg/ml)
Agua	83.0
Etanol 100 %	26.0
Propilenglicol	93.0
Etanol 96 %	> 100
Metanol	> 100
2-propanol	4.6
Acetato de etilo	1.0
Dimetilformamida	> 100
Cloruro de metileno	> 100
Hexano	0.001

i. Poder de difracción de rayos X.

El modelo del poder de difracción de rayos X del clorhidrato de verapamilo se presenta en la tabla C9⁽¹²⁾.

Tabla C9

Espacios d(A°*)	Intensidades I/Io**	Espacios d(A°*)	Intensidades I/Io**
18.5	5	3.84	20
10.3	7	3.73	45
8.3	5	3.51	20
7.7	3	3.45	15
6.9	10	3.358	35
6.7	10	3.19	3
6.3	3	3.12	5
6.1	100	2.87	1
5.9	1	2.79B	3
5.25	30	2.6B	2
5.15	5	2.34	1
4.9	40	2.19B	2
4.7	3	2.15	1
4.6	1	2.05	1
4.35	50	1.91	1
4.15	3		

*d = $n/2 \text{ sen } \theta$ **I/Io=Intensidad relativa.
(basada en la intensidad de los más altos).

j. Rango de fusión.

140 - 144°C^(11, 12)

k. Barrido calorimétrico diferencial.

El barrido calorimétrico diferencial del clorhidrato de verapamilo se muestra en la figura C8.

Velocidad del barrido: 10°C/min. Exhibe una pronunciada endoterma de fusión con una temperatura de 243°C y un pico a 148°C. No hubo evidencia de descomposición arriba de 250°C⁽¹²⁾.

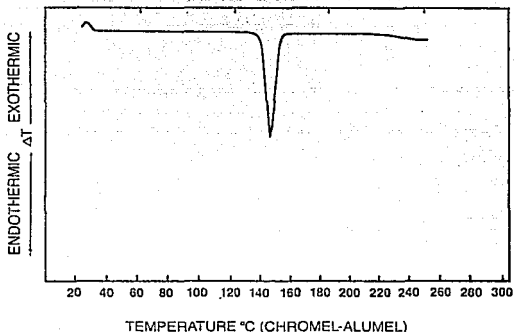


Figura C8. Curva de análisis del barrido calorimétrico diferencial del clorhidrato de verapamilo.

1. pKa.

La titulación del clorhidrato de verapamilo con solución 0.1N de KOH en metanol-agua como disolvente y extrapolación al agua pura, da un pKa de 8.6⁽¹²⁾.

m. Higroscopicidad.

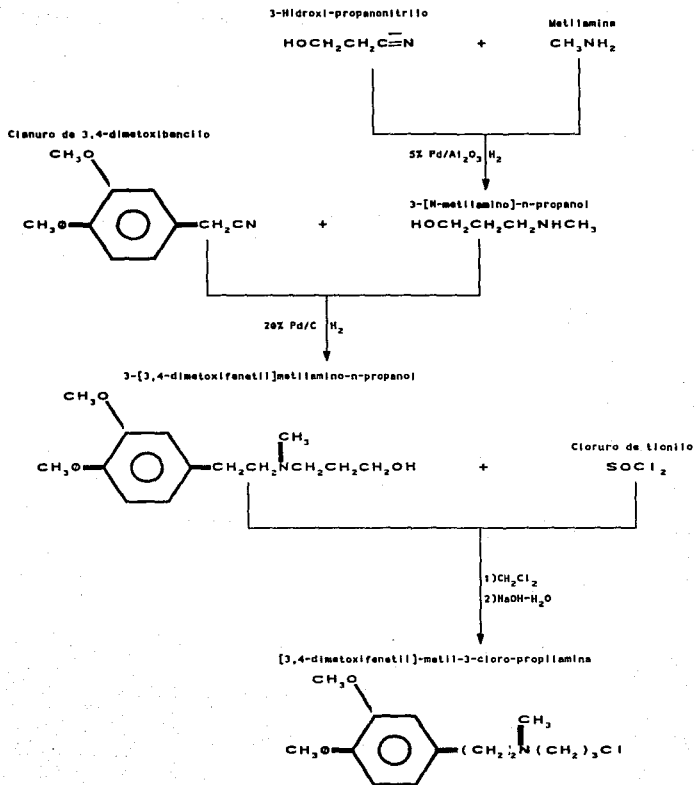
Higroscopicidad negligible. Se sometió una muestra a un 79 % de humedad relativa a temperatura ambiente durante toda la noche y sólo se observó una absorción de humedad del 0.47 %⁽¹²⁾.

n. Rotación óptica.

Una solución de clorhidrato de verapamilo al 1 % en metanol no exhibe actividad óptica al medirlo en un polarímetro de 241 a 589 nm en una celda de un cm, a 25°C⁽¹²⁾.

3. Síntesis.

En la figura C9 se muestra una vía de preparación del clorhidrato de verapamilo.



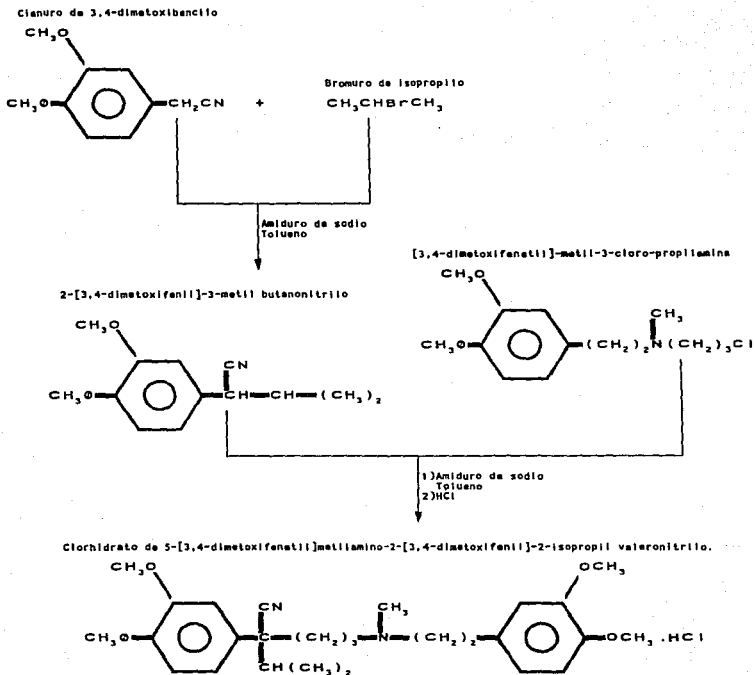


Figura C9. Síntesis del clorhidrato de verapamillo.

4. Estabilidad.

Bajo condiciones degradativas fotoquímicas y térmicas extremas, es muy estable en estado sólido. También es muy estable bajo condiciones de reflujo acuoso neutro, ácido y básico. Sin embargo cuando se disuelve en metanol y se somete a luz U.V. durante dos horas, muestra rápida degradación (52 %) (12).

5. Métodos de Análisis.

Cualitativos:

a. Identificación por espectrofotometría infrarroja (2, 11, 12, 23).

b. Pruebas de identificación.

Las reacciones de identificación reportadas son:

1) La muestra da positiva la reacción de identificación de cloruros.

2) Formación de un precipitado blanco al mezclar 2 ml de una solución de clorhidrato de verapamilo al 1 % (P/V) con 0.2 ml de una solución al 5 % (P/V) de cloruro mercúrico.

3) Cuando se mezclan 2 ml de una solución de clorhidrato de verapamilo al 1 % (P/V) con 0.5 ml de ácido sulfúrico 3M y 0.2 ml de una solución de permanganato de potasio se forma un precipitado violeta, el cual se disuelve rápidamente para producir una solución amarillo pálido (2, 11, 23).

c. Análisis cromatográfico.

Cromatografía en capa fina (c.c.f.) (2, 11, 12)

Sistema de solventes	Adsorbente	Agente para visualizar
Alcohol t-butílico: alcohol sec-butílico: ácido acético glacial: agua (20:50:7:25).	Sílica gel 60	Sulfato cérico- molibdato Rf=0.37
Tolueno:metanol:acetona: ácido acético glacial (70:20:5:5)	Sílica gel 60	Vapor de yodo o Reactivo de Dragendorff Rf=0.27

Sistema de solventes	Adsorbente	Agente para visualizar
Ciclohexano:dietilamina (85:15)	Sílica gel 60	FeCl ₃ 6H ₂ O-yodo Rf=0.25
Cloruro de metileno: acetona:dietilamina (80:15:5)	Sílica gel 60	Vapor de yodo o Reactivo de Dragendorff Rf=0.66.

Quantitativos:

a. Espectroscopía U.V.

El espectro de absorción U.V. de la muestra a una concentración de 20 µg/ml en solución 0.01N de ácido clorhídrico presenta dos máximos, a 229 y a 278 nm. La relación de las absorbancias entre las dos longitudes de onda se encuentra entre 0.35 y 0.39^(2, 11, 12).

b. Análisis elemental⁽¹²⁾.

Elemento	% Teórico	% Encontrado
C	66.04	66.32
H	8.01	8.08
N	5.70	5.72
O	13.03	12.77
Cl	7.22	7.37

c. Análisis cromatográfico.

Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)
(12, 23).

Fase móvil: Solución reguladora de fosfatos 0.2M pH=7.5:
agua:acetonitrilo:metanol (1:26:40:33).

columna: Zorbax ODS, 4.6 mm d.i. x 25 cm.

velocidad de flujo: 1.8 ml/min.

tiempo de retención: Aprox. 8 min.

Fase móvil: Disolver 3 g de dodecilsulfato de sodio en
360 ml de agua destilada y 140 ml de
metanol, diluir con acetonitrilo a un
litro. Ajustar la solución con ácido
perclórico a pH=2.5.

columna: Zorbax ODS 4.6 mm d.i. x 25 cm.

velocidad de flujo: 1.5 ml/min.

tiempo de retención: Aprox. 14 min.

Fase móvil: Solución reguladora de fosfatos 0.1M pH=3:
acetónitrilo (60:40).
columna: Bondapak C18, 4.6 mm d.i. x 30 cm.
Velocidad de flujo: 2ml/min.
tiempo de retención: Aprox. 4 min^(12, 23).

d. Métodos oficiales de valoración.

1) En medio no acuoso.

El clorhidrato de verapamilo exhibe condiciones básicas y puede ser valorado con solución 0.1N de ácido perclórico, empleando ácido acético glacial como disolvente de la muestra y en presencia de acetato mercúrico. El punto final de la valoración se determina potenciométricamente o visualmente si se usa una solución indicadora de cristal violeta y la solución vira a color verde esmeralda.

2) Titulación con nitrato de plata.

El ión cloruro del clorhidrato de verapamilo puede ser titulado con una solución 0.1N de nitrato de plata, empleando agua como disolvente de la muestra y determinando el punto final potenciométricamente o visualmente, usando como indicador 1 ml de diclorofluoresceína ST hasta el vire a color rosa pálido^(2, 11, 12, 23).

Análisis de formulaciones farmacéuticas.

Inyectables y tabletas pueden analizarse por CLAR usando trifenileno como estándar interno, se utiliza una columna Zorbax ODS y como fase móvil una solución reguladora de fosfatos 0.2M pH=7.5:agua:acetónitrilo:metanol (1:26:40:33). Las soluciones inyectables se han analizado usando una columna micro-Bondapak y como fase móvil solución reguladora de fosfatos 0.1M pH=3:acetónitrilo (60:40)⁽¹²⁾.

Determinación del verapamilo en fluidos biológicos.

En fluidos biológicos y en tejidos, el verapamilo se ha analizado por el método espectrofluorométrico. Sin embargo, este método no es específico, ya que además del verapamilo, detecta a todos los metabolitos fluorescentes.

Se han usado procedimientos fragmentográficos de masas para determinar al verapamilo en plasma humano y a pesar de que este procedimiento es lo suficientemente sensible y específico, no es aplicable para monitoreo rutinario de un gran número de muestras debido a su complejidad y a la necesidad de usar equipo altamente sofisticado.

También se reporta la determinación del verapamilo en plasma y orina por cromatografía de gases. Se han publicado procedimientos para determinarlo junto con su metabolito activo, el norverapamilo, en plasma y sangre por medio de CLAR, lo cual permite hacer la determinación de ambos, simultáneamente. Estas dos técnicas son sensibles para niveles de verapamilo en plasma de uno a cinco ng/ml⁽¹²⁾.

6. Propiedades Farmacológicas.

a. Efectos electrofisiológicos cardíacos.

El verapamilo, tiene efectos directos sobre las propiedades eléctricas y mecánicas de las células del músculo cardíaco y músculo liso vascular⁽¹³⁾.

b. Efectos electrocardiográficos.

El verapamilo disminuye la frecuencia cardíaca y aumenta el intervalo P-R en ritmo sinusal. En pacientes con fibrilación auricular, disminuye sustancialmente la frecuencia ventricular⁽¹³⁾.

c. Sistema Nervioso Autónomo.

El verapamilo, no tiene propiedades colinérgicas o de bloqueo β -adrenérgico. Sin embargo, posee actividad de α -bloqueo-adrenérgico, lo que explica su efecto sobre las arritmias que se ven después de la liberación de una obstrucción coronaria experimental⁽¹³⁾.

d. Farmacocinética.

El verapamilo se absorbe eficazmente por vía oral pero la biodisponibilidad es baja (aprox. 20 %), debido a un amplio metabolismo del primer paso en el hígado. La extensión del metabolismo disminuye con un tratamiento oral prolongado y la biodisponibilidad aumenta. Los efectos del verapamilo son evidentes de una a dos horas después de su administración y su vida media plasmática tiene un promedio de cinco horas, pero aumenta con una

administración prolongada al igual que ocurre en niños y en ancianos.

En pacientes con cirrosis hepática, la vida media del verapamilo puede aumentar cuatro veces y también aumenta la biodisponibilidad. Por lo tanto, en estos pacientes las dosis orales deben reducirse en un 80 % y las dosis intravenosas en un 50 %. El fármaco se une a proteínas plasmáticas en un 90 %. El intervalo del volúmen de distribución aparente es de 2.5 a 5.0 l/Kg. El norverapamilo, un metabolito producido por N-demetilación, es biológicamente activo, pero es un vasodilatador menos potente. Se acumula hasta concentraciones iguales a la del verapamilo después de una administración oral prolongada. La vida media del norverapamilo es de 8 a 10 horas y puede aumentar a 13 horas con una administración continua. Por vía i.v. el máximo efecto del verapamilo es evidente en 10 a 15 minutos. Puesto que los metabolitos son excretados principalmente por los riñones, puede ser necesario disminuir la dosis en pacientes con función renal reducida.

Se ha estudiado cualitativamente y cuantitativamente a las 48 horas la orina de cuatro sujetos que recibieron 80 mg (C-14 verapamilo) en 100 ml de agua. La N-desalquilación es la principal vía metabólica del verapamilo, se obtiene una amina secundaria (22%) y una terciaria (3-4 %).

El producto N-desmetilado (norverapamilo) corresponde al 6 % de los metabolitos urinarios colectados en 48 horas. Los productos o-demetilados de todos esos compuestos representan prácticamente 16-17 % de la dosis administrada y se excretan como conjugados inactivos.

El metabolismo del clorhidrato de verapamilo se ha estudiado en humanos, perros y en ratas, obteniendo resultados similares en las tres especies^(1, 12, 13).

e. Farmacodinamia.

En un estudio in vitro el verapamilo mostró ser igualmente potente para deprimir la contractilidad miocárdica que para inhibir el tono vascular del músculo liso, ésto significa que no es selectivo vascular. También se sabe, que el verapamilo tiene un efecto inhibidor marcado sobre los nodos SA y AV in vitro.

Clínicamente, los efectos depresores cardíacos son equilibrados por estimulación simpática y otros mecanismos contrarreguladores. De cualquier manera, en la clínica se observa que si se prolonga la conducción AV, la frecuencia cardíaca no sufre cambio, o se reduce y la contractilidad cardíaca no se deteriora en el corazón sano, pero puede ser afectada negativamente en el corazón enfermo. Debido a los efectos inotrópicos y dromotrópicos negativos; el verapamilo es menos adecuado para ser combinado con un β -bloqueador. El verapamilo dilata los vasos de resistencia arteriolar (bajando así la resistencia periférica) y es por tanto, útil como agente antihipertensivo y contra las arritmias supraventriculares. Su uso en la angina de pecho está justificado por su acción vasodilatadora coronaria y por reducción de la postcarga (dilatación de vasos de resistencia). La ausencia de taquicardia refleja inicial puede ser beneficiosa cuando se emplea como monoterapia en angina de pecho⁽¹⁾.

7. Mecanismo de acción.

El verapamilo es un antagonista de calcio sintetizado y desarrollado por Knoll. Su estructura básica es la de una fenilalquilamina. Su mecanismo de acción antihipertensivo se efectúa mediante la inhibición de la entrada del ion calcio a la célula, ejerciendo una eficiente modulación del flujo interno del calcio ionizado a través de la membrana celular del músculo liso arteriolar^(1, 13, 15).

8. Usos terapéuticos.

- a. Arritmias supraventriculares.
- b. Arritmias ventriculares.
- c. Angina variante.
- d. Angor de esfuerzo.
- e. Angor inestable.
- f. Hipertensión arterial esencial, leve, moderada o grave^(1, 13, 15).

9. Preparaciones, Dosis y Vías de administración.

El clorhidrato de verapamilo se presenta en tres formas farmacéuticas: tabletas, grageas (40, 80, 120 y 180 mg) y como inyectable (5 mg/2ml)^(9, 13).

Angina de pecho y arritmias: 80 a 160 mg, 3 a 4 veces/día. Podría aumentar hasta 720 mg diarios.
Hipertensión: 80 a 160 mg, 2 a 3 veces/día^(1, 13, 15).

10. Toxicidad, Reacciones adversas y Contraindicaciones.

En general, las principales reacciones tóxicas asociadas con el uso de bloqueadores de los canales de calcio involucran vasodilatación excesiva, efectos inotrópicos negativos, depresión de la frecuencia del nódulo sinusal y alteraciones de la conducción del nódulo A-V.

Aunque se ha informado bradicardia, asistolia transitoria, hipotensión y exacerbación de una insuficiencia cardíaca, estas respuestas habitualmente han ocurrido con el medicamento por vía i.v. o en pacientes con enfermedad del nódulo sinusal o alteraciones de la conducción A-V o en presencia de bloqueo β -adrenérgico. El verapamilo es bien tolerado por vía oral. Un bajo porcentaje de pacientes experimenta cefaleas, mareos, náuseas, constipación, problemas alérgicos de la piel, edema periférico (edema de los tobillos), cansancio, bloqueo A-V de primer o segundo grado e hipotensión. El verapamilo puede causar un aumento de la concentración de digoxina en plasma, aunque rara vez se produce toxicidad por el glucósido cardíaco.

Los principales efectos adversos del verapamilo son cardíacos y gastrointestinales. Debido a sus efectos sobre el automatismo del nódulo sinusal, el verapamilo debe administrarse con mucho cuidado a pacientes con disfunción del nódulo, puede producirse una bradicardia sinusal inesperada, bloqueo A-V, insuficiencia ventricular izquierda o hipotensión en ancianos, luego de la administración i.v. de verapamilo. Es por ello, que deben usarse dosis menores y una velocidad más lenta de inyección en pacientes mayores de 60 años.

El uso de verapamilo i.v. con un β -bloqueante está contraindicado debido a la mayor propensión a bloqueo A-V y/o severa depresión de la función ventricular. Los pacientes con disfunción ventricular, alteraciones de la conducción en el nódulo sinusal o A-V y presiones sistólicas por debajo de 90 mm Hg no deben ser tratados con verapamilo, particularmente i.v. También está contraindicado su uso, para tratar la intoxicación digitalica. El verapamilo puede aumentar la frecuencia

ventricular cuando se administra por vía i.v. a pacientes con síndrome de Wolff-Parkinson-White y fibrilación auricular; ésto se debe a un aumento reflejo de la actividad simpática. Tampoco debe administrarse a pacientes con infarto de miocardio agudo, choque cardíaco-génico, insuficiencia miocárdica, bradicarida, y función hepática deteriorada^(1, 13, 15).

11. Interacciones con otros medicamentos.

El uso concomitante de verapamilo y de bloqueadores β -adrenérgicos o digital puede llevar a una significativa bradicarida o bloqueo A-V. Además, el verapamilo interactúa con la digoxina en una forma similar a la interacción quinidina-digoxina. Durante el tratamiento con verapamilo, una fracción importante de los pacientes puede presentar un aumento significativo de la concentración de digoxina en plasma debido a una disminución de la depuración del glucósido cardíaco. El uso concomitante de verapamilo y fármacos antihipertensivos que deprimen el nódulo sinusal, como reserpina o metildopa, puede intensificar la bradicardia sinusal⁽¹³⁾.

12. Seguridad.

Por las contraindicaciones ya referidas, el verapamilo no es seguro para todos los tipos de pacientes.

Puntos fuertes:

- a. Está bien establecido.
- b. Adecuado para angina de pecho y arritmias.
- c. Se considera que es bien tolerado.
- d. No hay aumento de frecuencia cardíaca.
- e. Una nueva formulación del verapamilo ha demostrado que basta una dosis única diaria para tener niveles plasmáticos útiles y que su actividad antihipertensiva sea plena.
- f. Eficaz en cualquier tipo de hipertensos (de cualquier edad, asmáticos, diabéticos).

Puntos débiles:

- a. No selectivo (inotropía negativa), inhibición A-V.
- b. No se debe combinar con β -bloqueadores y antiarrítmicos.
- c. Metabolitos activos que se acumulan cuando la función renal está deteriorada.
- d. La insuficiencia cardíaca y el bloqueo A-V son contraindicaciones.
- e. Sin perfil de hipertensión "puro".
- f. Dosificación dos al día en la mayoría de los mercados^(1, 15).

D. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN.

Todos los átomos y moléculas son capaces de absorber energía, de acuerdo con ciertas limitaciones, que dependen de la estructura de la sustancia. La energía se puede proporcionar en forma de radiación electromagnética (<<luz>>). El tipo y cantidad de radiación absorbida por una molécula guarda relación con su estructura, así como con el número de moléculas que interaccionan con la radiación. El estudio de estas dependencias se conoce como **Espectroscopia de absorción**. Esta, es una de las técnicas analíticas más interesantes de las descubiertas hasta la fecha. A pesar de los nuevos avances en química analítica, probablemente permanecerá como un instrumento útil debido a sus varias y preponderantes ventajas en la solución de muchos problemas. Estas ventajas incluyen rapidez, sencillez, especificidad y sensibilidad.

La espectrofotometría de absorción consiste en la medida de absorción, por las diferentes sustancias, de una radiación electromagnética de longitudes de onda situadas en una banda definida y estrecha, esencialmente monocromática.

La radiación electromagnética es la energía propagada en forma de onda, de la cual la luz visible constituye parte.

La longitud de onda es la distancia lineal desde cualquier punto de la onda hasta el punto correspondiente de la onda adyacente. La dimensión de la longitud de onda corresponde a la de una longitud, y se expresa en cm o:

$$1 \text{ \AA ngstr\AA om (\AA)} = 10^{-8} \text{ cm} = 10^{-10} \text{ m}$$

$$1 \text{ nan\AA metro (nm)} = 10^{-9} \text{ m} = 10^{-7} \text{ cm} = 1 \text{ milimicr\AA metro (\mu\text{m})}$$

$$1 \text{ micr\AA metro (\mu\text{m})} = 10^{-6} \text{ m}$$

El s\xedmbolo m\xe1s com\xfan para la longitud de onda es la letra griega lambda (λ) y la dimensi\xf3n preferida es nm. La longitud de onda variar\xe1 de acuerdo con la velocidad, la cual cambia, cuando la luz pasa de un medio a otro⁽⁵⁾.

El espectro de radiaci\xf3n electromagn\xe9tica se muestra en la tabla D1 (5,21).

Tabla D1

Rango	Longitud de onda (nm) *
Rayos cósmicos	$10^{-5} - 10^{-4}$
Rayos gamma	$10^{-4} - 10^{-1}$
Rayos X	$10^{-1} - 10$
Ultravioleta	$10 - 10^2$
Visible	$10^2 - 10^3$
Infrarrojo	$10^3 - 10^5$
Microondas	$10^5 - 10^8$
Ondas de radio	$10^8 - 10^{15}$

* Ordenes de magnitud redondeadas.

Los intervalos que tienen interés en espectroscopía se muestran en la tabla D2⁽⁵⁾.

Tabla D2

Regiones	Longitud de onda
Ultravioleta lejano	100 - 200 nm
Ultravioleta	200 - 400 nm
Visible	400 - 750 nm
Infrarrojo cercano	0.75 - 4 μm
Infrarrojo	4 - 25 μm

1. Aplicaciones cuantitativas de los espectros de absorción.

El uso de la espectrofotometría de absorción en las zonas visible y ultravioleta como procedimiento de valoración se basa en el hecho de que la absorptividad de una sustancia es una constante independiente de la intensidad de la radiación incidente, la longitud interior de la celda y la concentración, por lo cual la concentración se puede determinar fotométricamente.

El análisis espectroscópico cuantitativo se basa en la relación entre la cantidad de luz absorbida y la cantidad de sustancia absorbente. Las cantidades espectroscópicas que se miden son la Transmitancia, T y la Absorbancia, A .

$$T = I_0/I$$

$$A = \log (1/T)$$

I_0 = Intensidad de la luz incidente

I = Intensidad de la luz después de pasar a través del espesor de la solución.

Ley de Beer.

" La absorbancia de una solución es directamente proporcional a la concentración del soluto absorbente" y se expresa con la siguiente ecuación:

$$A = abc.$$

A = Absorbancia

a = absortividad

b = longitud del paso de luz interno de la celda que contiene la muestra

C = concentración de la muestra.

A menudo se asocian los nombres de Bouguer y Lambert con la dependencia de la absorbancia sobre el paso de luz b , a través de la ecuación de Beer-Lambert.

La absortividad a , depende de la temperatura, del disolvente, de la estructura molecular y de la longitud de onda de la radiación; sus unidades se determinan a partir de las de b y C . Cuando b está en cm y C en g/l, a se expresa en l/g cm. Si C es una concentración molar, la absortividad recibe el nombre de absortividad molar, se representa por ϵ y sus unidades son l/mol cm. Cuando C se expresa en porcentaje peso/volumen (g/100 ml), la absortividad se escribe $A^{1\%}$

1cm

La terminología de la espectroscopía de absorción puede originar confusiones debido al considerable número de términos sinónimos. Por ésto, se presenta la nomenclatura espectroscópica en la tabla D3^(5, 21).

Tabla D3

Términos	Símbolos	Términos antiguos
Transmitancia	T	Transmisión
Porcentaje de transmisión	% T = 100 T	Porcentaje de transmisión
Absorbancia	A	Extinción, E; densidad, d; densidad óptica, D.O.; absorbencia
Absortividad	a	Coefficiente de extinción, índice de absorbencia, extinción específica, E
Absortividad molar	ϵ	Coefficiente de extinción molar
Longitud de paso	b	d
Concentración	C	-----

Un espectro de absorción se determina midiendo la absorbancia o transmitancia de una solución como función de la longitud de onda o frecuencia de la luz.

Los espectros infrarrojos suelen representarse como porcentaje de transmitancia en relación con la longitud de onda. Los espectros visibles y U.V., se presentan más a menudo como trazados de la absorbancia respecto a la longitud de onda. Las longitudes de onda que corresponden al máximo y al mínimo de la gráfica absorbancia-longitud de onda, se simbolizan por λ máx. y λ mín.

No es posible identificar totalmente un compuesto basándose en su espectro de absorción, sin embargo, los datos espectrales pueden desempeñar un papel importante en la elucidación de los grupos funcionales presentes en la molécula y sus posiciones relativas en ella. Por lo que mediante dichos datos, es posible demostrar la ausencia de cromóforos, comparar espectros de compuestos similares con el espectro de un estándar, si se dispone de éste, obtener las posiciones de los máximos de banda y la absortividad molar. La relación de éstas últimas a dos longitudes de onda, es válida como criterio de identidad o pureza. Combinando los datos de longitud de onda y de absortividades con los de concentración, se puede intentar la identificación de muchos fármacos por espectroscopía U.V.⁽⁵⁾

2. Análisis de un componente único.

Si de una serie de soluciones de la misma sustancia se mide la absorbancia de cada una de ellas a la misma longitud de onda, temperatura y condiciones de disolución y se representa la absorbancia de cada solución en función de su concentración, se obtendrá por lo general, una línea recta que pasa por el origen, ésta se denomina Trazado de la ley de Beer; y si la línea es recta, se dice que sí cumple con dicha ley en el margen de concentración investigada. La pendiente de la línea es igual a ab y puesto que se conoce b , se puede calcular la absorptividad, a . Otra posible aplicación de estos datos espectrales implica el cálculo de a para cada par de datos absorbancia-concentración; si a es constante, se cumple la ley de Beer.

La longitud de onda seleccionada para la determinación de la absorptividad es usualmente $\lambda_{\text{máx}}$, por dos razones:

a. La sensibilidad máxima se alcanza trabajando en el máximo de la banda puesto que una concentración dada produce la señal más fuerte a esta longitud de onda.

b. La variación de la absorbancia para pequeños cambios de la longitud de onda es mínima en el máximo de la banda; por consiguiente, los inevitables pequeños errores en la fijación del selector de longitud de onda del instrumento no serán causa de grandes errores en la medida de la absorbancia.

Si se conoce la absorptividad de una sustancia (a una longitud de onda fija), se puede realizar fácilmente el análisis de muestras de concentración desconocida de esta misma sustancia. Se prepara una solución de la sustancia en el mismo disolvente utilizado para las muestras conocidas; la concentración estimada para esta solución deberá estar dentro del intervalo de las concentraciones usadas en el estudio de la Ley de Beer. Se mide la absorbancia de la muestra desconocida a la longitud de onda analítica. Se calcula la concentración desconocida a partir de la gráfica de la Ley de Beer; o bien, se lee directamente la concentración desconocida a partir de la gráfica. Para que estas sencillas técnicas analíticas sean aplicables es necesario que no esté presente ninguna sustancia interferente, (ésto es, una sustancia capaz de absorber luz de longitud de onda analítica), en la muestra. En una versión simplificada de estos métodos, se emplea una medida concomitante "unipuntual" de la solución de la muestra y una solución patrón del mismo compuesto cuya pureza se conoce. Se efectuá el mismo

procedimiento con el patrón y con la muestra:

$$Cs = \frac{Cr \cdot As}{Ar}$$

As = abCs s = muestra

Ar = abCr r = patrón de referencia

Los procedimientos de ensayos espectrofotométricos de la USP y del NF suelen exponer explícitamente este método de análisis y la ecuación final puede incluir un factor para la dilución de la muestra.

La absorptividad de una sustancia en condiciones determinadas, es una constante física que una vez determinada, no necesita medirse de nuevo.

Una clasificación aproximada de los compuestos, de acuerdo con la intensidad de su absorción, indicará los márgenes de concentración dentro de los cuales suele ser posible el análisis espectrofotométrico. En la tabla D4 se presenta la intensidad de las bandas de absorción electrónicas. La absorbancia, para la mayoría de los instrumentos estaría en el intervalo de 0.2 - 2. Si se considera una celda de un cm y se toma como óptimo una absorbancia de 1.0. la ley de Beer ofrece las concentraciones molares aproximadas requeridas para obtener buenos resultados espectrofotométricos⁽⁵⁾.

Tabla D4

Tipos de absorción	εmáx.
Muy débil	1 - 10
Débil	10 - 100
Moderada	100 - 1000
Fuerte	1000 - 10000
Muy fuerte	10000 - 100000

3. Efectos del medio.

Los espectros de absorción de una muestra dependen de las condiciones del medio; ya que la longitud de onda de máxima absorción puede cambiar al modificar el disolvente de la muestra debido a que las interacciones soluto-solvente serán diferentes. También se advierten otros

efectos notables en los espectros de ácidos y bases cuando se varía el pH del medio, se han descrito los desplazamientos espectrales para muchos fármacos siendo ésta una manera de identificarlos⁽⁵⁾.

4. Medida de los espectros de absorción.

Se denomina espectrómetro a todo instrumento utilizado en la medida de un espectro; si la intensidad de luz se mide con una celda fotoeléctrica, el instrumento es un espectrofotómetro. Un espectrómetro diseñado para realizar medidas de absorción únicamente en la región visible, se denomina colorímetro.

Todos los espectrofotómetros, se componen de los elementos que aparecen en la figura D1.

El orden en que estas partes se disponen puede variar ligeramente; los materiales y detalles de construcción dependen del intervalo de longitud de onda que se va a estudiar. Se necesitan dos tipos generales de instrumento:

- a) Los espectrofotómetros de ultravioleta, que miden espectros electrónicos en la región U.V. y en la visible.
- b) Los espectrofotómetros de infrarrojo, para la región espectral más allá de un μm .

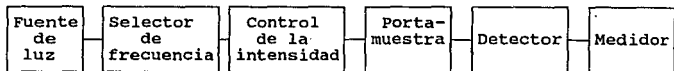


Figura D1. Componentes de un espectrofotómetro.

A continuación se presenta una breve descripción de las partes básicas de un espectrofotómetro:

a. Fuente de luz. Una lámpara de tungsteno corriente para la región visible y en la U.V. una lámpara de descarga de hidrógeno.

b. Selector de frecuencias. Es necesario contar con la opción de escoger a voluntad la longitud de onda (o la frecuencia) de la radiación. Por lo general, el elemento dispersante en un espectrofotómetro, es un prisma. Para la luz visible, el vidrio es un buen material; para la luz U.V. un prisma de sílice. Al prisma con los elementos ópticos asociados, se le conoce como monocromador.

c. Control de la intensidad. En la mayoría de los espectrofotómetros hay uno o más mecanismos de rendijas, accionados manual o automáticamente, cuya anchura se varía, controlando así la intensidad de luz que alcanza la muestra.

d. Portamuestra. Todos los estudios espectrales en las regiones U.V. y visible se efectúan en soluciones diluidas. Las celdas que contienen la muestra deben ser transparentes a la luz, se emplean de vidrio en la región visible y de sílice en el U.V.

e. Detector. En los espectrofotómetros de visible y U.V. se emplean dispositivos electrónicos sensibilizadores, que se conocen como fototubos y tubos fotomultiplicadores, para detectar la intensidad de luz transmitida por la muestra.

f. Medidor o registrador. Los registradores trazan un registro de la absorbancia o la transmitancia sobre papel cuadrulado; con estos instrumentos se registra automáticamente el espectro de absorción completo, y el propio instrumento "explora" el intervalo de longitud de onda y dibuja la curva absorbancia-longitud de onda. Se calibra el instrumento medidor de modo que proporcione directamente la transmitancia o la absorbancia. Cada valor de A o de T , es el resultado de dos medidas, de I_0 e I (5, 10).

E. CROMATOGRAFIA

La cromatografía es una técnica de separación ampliamente usada por varias razones: permite aplicarla a un gran número de compuestos diferentes. Tiene alta sensibilidad, rápida separación, y relativamente bajo costo. Se basa en la diferente velocidad con que se mueven los solutos a través de un medio estacionario mediante el flujo de un disolvente llamado eluyente. Las únicas sustancias que no pueden ser examinadas por este método, son las insolubles y aquellas que se descomponen con el disolvente o con la fase estacionaria. Esta técnica es útil para separar a los componentes de una mezcla, emplea el equilibrio heterogéneo que se establece durante el flujo de un disolvente llamado fase móvil, (líquida o gas) a través de una fase estacionaria, (sólida o líquida). De esta manera, la cromatografía puede clasificarse en:

líquido-sólido
gas-sólido

líquido-líquido
gas-líquido

Si la fase estacionaria es un sólido, el proceso se llama cromatografía de adsorción; si es un líquido, la cromatografía se llama de partición^(22, 25).

1. Antecedentes históricos:

- Aprox. 1850. F. F. Runge, químico alemán, descubrió la cromatografía, al describir el proceso de separación conocido actualmente como cromatografía en papel.

- Entre 1903 y 1910. Mijail Tswett, botánico ruso, estableció las ventajas de la cromatografía, la adopción parcial de la terminología y sentó las bases de los principales procedimientos experimentales.

- Finales de los 30's y principios de los 40's. Se empezó a desarrollar la técnica, permitiendo la aplicación del método⁽⁵⁾.

2. Clasificación de la cromatografía

Por el mecanismo de separación:

a. Cromatografía de reparto: líquido-líquido
gas-líquido

- b. Cromatografía de adsorción: líquido-sólido
gas-sólido.
- c. Cromatografía de exclusión: filtración
permeación.
- d. Cromatografía de intercambio iónico.

Por la fase móvil:

- a. Si es un gas: gas-líquido
 gas-sólido.
- b. Si es un líquido: líquido-líquido
 líquido-sólido
 de exclusión
 de intercambio iónico.

La forma más común de cromatografía es la de adsorción, en donde la muestra a separar se aplica en un extremo de la fase estacionaria y la fase móvil fluye a través de ella por capilaridad. La separación ocurre cuando uno de los componentes de la mezcla se adsorbe más en la fase estacionaria que otros componentes. La adsorción es un fenómeno de superficie, es por ello que el tamaño de partícula de la fase estacionaria debe ser pequeño. El factor principal en cualquier tipo de cromatografía es el coeficiente de reparto o de distribución (K) de una sustancia entre las dos fases de un sistema:

$$K = \frac{\text{cantidad de soluto por unidad de fase estacionaria}}{\text{cantidad de soluto por unidad de fase móvil.}}$$

Este factor, depende de la temperatura y de la concentración del soluto.

La cromatografía de partición también se usa para separar diferentes compuestos, llevándose a cabo un equilibrio entre las dos fases involucradas, una de ellas es sostenida por un soporte inerte como celulosa o kieselguhr, y la otra es la fase móvil^(22, 25).

3. Cromatografía de líquidos.

Se puede realizar empleando como fase estacionaria papel filtro o un sólido finamente dividido colocado en forma de capa fina sobre un vidrio o en una columna rellena de

un sólido poroso pulverizado, el cual puede actuar como fase estacionaria, o como soporte de una fase estacionaria líquida. Estos tres sistemas se conocen como cromatografía en papel, en capa fina y en columna, respectivamente.

Para el análisis de una sustancia, existen dos conceptos muy importantes, son el R_f (referencia frontal) y el R_x (relación con un estándar x). El comportamiento migratorio de una sustancia se describe en función de la relación de las distancias recorridas:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por la sustancia}}{\text{distancia recorrida por el eluente.}}$$

Sus valores van desde 0 hasta 0.999 y es adimensional.

Si se quiere expresar la posición relativa con respecto a la de otra sustancia estándar X , entonces el valor que se emplea es el R_x :

$$R_x = \frac{\text{distancia recorrida por la sustancia}}{\text{distancia recorrida por la sustancia estándar } X}$$

Sus valores pueden ser mayores de 1, ya que es un valor de referencia relativa.

La distancia de migración del soluto se mide desde el punto de origen o aplicación hasta algún punto de la mancha, tomándose dicho punto constante. Las condiciones experimentales influyen mucho en los valores de R_f , por lo que no bastan para identificar a una sustancia; los valores de R_x varían muy poco y son reproducibles con mayor facilidad.

Cromatografía en capa fina (c.c.f.).

Es una forma de cromatografía de adsorción, en la que el adsorbente se coloca en forma de capa fina sobre una placa de vidrio. Sin embargo, es perfectamente factible efectuarla en forma de cromatografía de partición y probablemente hay muchos sistemas solventes que originan un efecto combinado de partición-adsorción durante la separación^(5, 22, 25).

Existen cuatro adsorbentes que son los más comúnmente utilizados: sílica gel, alúmina, kieselghur (tierra de

diatomeas) y celulosa. Puede incorporarse un agente aglutinante como el sulfato de calcio. Se mezcla el adsorbente con agua para formar una masa homogénea de la cual se aplica una capa uniforme sobre una placa de vidrio limpia. Una vez seca, la capa estará más o menos firmemente enlazada a la placa por la adición del agente aglutinante. El espesor de la capa es por lo general, de 0.25 mm.

Puesto que al preparar la placa se desactiva el adsorbente por contacto con agua, es necesario activarla por medio de calentamiento en una estufa. Las placas activadas se almacenan en un desecador.

La selección de la fase móvil depende de la fase estacionaria y de los solutos. Si un disolvente puro no separa bien la muestra, pueden emplearse mezclas de disolventes o de sustancias químicamente diferentes. Las muestras siempre se aplican en solución y puede hacerse en forma de punto o banda.

El desarrollo del cromatograma es ascendente y se realiza en cámaras recubiertas con papel filtro impregnado del eluente para saturar la atmósfera. Una vez desarrollado el cromatograma, se marca el frente del eluente y se deja secar. Si los compuestos son incoloros se procede a revelarlos, ya sea por métodos físicos o químicos.

Entre los primeros, se encuentra la absorción U.V. en donde los compuestos con electrones π pueden ser detectados, siendo característica la longitud de onda para cada compuesto. Los métodos químicos emplean agentes de revelado que pueden ser gases, líquidos o sólidos en solución y para aplicarse se usan dos métodos: de bañado y de atomización.

El R_f de la c.c.f. es reproducible si se reproducen las condiciones cromatográficas; siendo importantes en la determinación los siguientes factores: grosor, humedad y uniformidad de la capa del adsorbente, saturación de la cámara cromatográfica, temperatura, naturaleza del adsorbente, tamaño de la muestra y fase móvil. Siempre es conveniente el correr la cromatografía de muestras conocidas junto con la desconocida en la misma placa, para compensar las variaciones producidas por factores no controlados.

El análisis cuantitativo de las manchas separadas del cromatograma se efectúa raspando la capa adsorbente que contiene la mancha de la placa. Se separa el soluto

adsorbido de la fase estacionaria empleando el disolvente adecuado y se determina por un método analítico sensible, por lo general espectrofotometría o fluorometría.

Una ventaja considerable de la c.c.f. sobre la cromatografía en papel es su mayor sensibilidad, debida al grano fino de las partículas de adsorbente comparadas con las fibras del papel. En la c.c.f. la muestra permanece concentrada en una zona más pequeña y por tanto, es posible detectar una muestra más pequeña. Otra ventaja, es su rapidez de revelado.

La principal aplicación de la c.c.f. consiste en detectar e identificar compuestos en mezclas complejas. La correspondencia de los valores de Rf de una especie auténtica y de la sustancia desconocida es un criterio de identidad (aunque no una prueba). Si los Rf coinciden de nuevo cuando se altera el sistema solvente, se suele considerar fortalecida la prueba cromatográfica, aunque se aconseja precaución al establecer la identidad. Por lo general, se combina alguna prueba no cromatográfica (como historia de la muestra, U.V., IR, EM, RMN, reacciones coloridas, etc.) con los datos de Rf para establecer la identidad. Esta técnica también es un poderoso instrumento para detectar impurezas. Si el cromatograma de una sustancia no dá una banda sencilla, cabe formular suposiciones de posibles impurezas en la muestra y será posible comprobar si son impurezas indeseables o no.

Ventajas de la c.c.f.

- a. Utiliza volúmenes pequeños de disolvente.
- b. La polaridad de la fase móvil puede cambiarse rápidamente.
- c. Es el método cromatográfico más sencillo para un compuesto específico.
- d. No requiere equipo ni materiales sofisticados.
- e. Puede aplicarse un gran número de muestras al mismo tiempo.
- f. Frecuentemente usada para desarrollar sistemas de fase móvil para CLAR.
- g. Mediante esta técnica, se puede verificar la pureza de la sustancia que se está sometiendo a la prueba⁽²²⁾.

C A P I T U L O I I

M E T O D O L O G I A

A. EQUIPO, INSTRUMENTOS Y MATERIAL UTILIZADO.

1. ESPECTROFOTOMETRO UV/VIS.

Marca: Beckman, modelo: DU - 65
Método de Calibración utilizado: Manual del fabricante
(Soft-pack de Validación).
Fechas de calibración: 28 - Diciembre - 1992
29 - Marzo - 1993
Vigencia de la calibración: Tres meses.

PARAMETROS EVALUADOS PARA LA CALIBRACION:

- a. Línea basal
- b. Exactitud de la longitud de onda
- c. Repetibilidad de la longitud de onda
- d. Resolución
- e. Ruido a 500 nm
- f. Exactitud de longitud de onda utilizando el filtro de óxido de holmio
- g. Desviación de la luz
- h. Estabilidad de la línea basal
- i. Linealidad fotométrica.

Conclusión de la calibración: Equipo aprobado.

2. BALANZA ELECTRONICA.

Marca: Mettler, modelo: AE - 200
Alcance: 0.1 mg a 50 g
Valor de pesada mínima: 0.1 mg
Método de calibración utilizado: Procedimiento de calibración interno.
Error máximo permisible para las pruebas: 0.3 mg
Marco de pesas utilizado: Clase E - 2
Fecha de calibración: 28 - Diciembre - 1992
Vigencia de la calibración: Seis meses

PARAMETROS EVALUADOS PARA LA CALIBRACION:

- a. Limpieza del instrumento
- b. Nivelación del instrumento
- c. Calibración interna
- d. Ajuste de cero

- e. Prueba de movilidad
- f. Prueba de fidelidad (Excentricidad)
- g. Exactitud y Linealidad.

Conclusión de la calibración: Instrumento aprobado.

3. AGITADOR O BAÑO ULTRASONICO.

Marca: Ney, modelo: Ultrasonik 300

4. MATERIAL.

a. De vidrio:

Matraces volumétricos de 50 y 100 ml marca Pyrex
Pipetas volumétricas de 2 y de 3 ml marca Pyrex
Vasos de precipitados de 150 ml marca Pyrex y Kimax

b. Otros:

Embudos de filtración de plástico
Papel filtro Whatman No. 1
Parafilm
Espátula de cromo-níquel
Mortero de porcelana

B. REACTIVOS, SOLUCIONES Y SUSTANCIA DE REFERENCIA.

1. METANOL, R.A., Merck.

2. ACIDO CLORHIDRICO 0.1 N.

3. FASE ESTACIONARIA.

Placas de vidrio recubiertas con Sílica gel F₂₅₄ de 0.25 mm de espesor, Merck.

4. FASE MOVIL.

Tolueno: Metanol: Acetona: Acido acético glacial (50:40:5:5).

5. CLOROFORMO, R.A. Merck.

6. PEROXIDO DE HIDROGENO AL 30 %, Merck.

7. CLORHIDRATO DE VERAPAMILO.

Estándar secundario (No. Lote:53182) estandarizado.

8. REVELADOR EMPLEADO PARA LA C.C.F.

Cloruro de hierro (III)- Yodo.

C. OPTIMIZACION DEL METODO ANALITICO

La optimización, consiste en mejorar un método ya existente con el propósito de obtener el mayor rendimiento posible del equipo analítico, mejorar el porcentaje de recuperación del (los) principio(s) activo(s) que se desea determinar, disminuir el volumen de reactivos que intervienen en el análisis, así como también, disminuir su tiempo de realización.

Los métodos analíticos para determinar al clorhidrato de verapamilo contenido en las cuatro formulaciones que en el presente trabajo se analizan ya estaban establecidos pero no validados. Fué necesario unificar la técnica para los cuatro productos llevando a cabo ciertas modificaciones como:

- a. Ajuste en la concentración de la muestra.
- b. Cambio en el método de agitación para la extracción del principio activo (agitación magnética por ultrasónica).
- c. Ajustar el tiempo de agitación de las muestras.
- d. Emplear el mismo disolvente de la muestra para los cuatro productos.
- e. Se realizó un barrido U.V. (325 - 200 nm) de una solución estándar de clorhidrato de verapamilo para determinar la longitud de máxima absorción, la cual correspondió a 279 nm.

TECNICA ANALITICA.

Para las formulaciones I, II y III, triturar 10 tabletas o 10 grageas y pesar el equivalente a una de ellas, para la formulación IV triturar 20 grageas y pesar el equivalente a dos de ellas. Colocar el polvo en un matraz volumétrico de 100 ml y adicionar 70 ml de una mezcla de solventes: Metanol:HCl 0.1 N (9:1), agitar manualmente hasta desprender el polvo del matraz y colocar el matraz en un baño ultrasónico durante 10 minutos (cubriendo el tapón del matraz con Parafilm). Llevar a volumen con la mezcla de solventes. Mezclar y filtrar a través de papel Whatman No. 1 desechando los primeros mililitros del filtrado. Tomar una alícuota de 2 ml (formulación I y II) o 3 ml (formulación III y IV), pasarla a un matraz volumétrico de 100 ml y llevar a volumen con la mezcla de solventes.

Preparar una solución estándar de la siguiente manera:

Formulación I: Pesar exactamente 90 mg clorhidrato de verapamilo, colocarlos en un matraz volumétrico de 50 ml, disolverlos con aprox. 30 - 35 ml de la mezcla de solventes y llevar a volumen con la misma solución. Tomar una alícuota de 2 ml, pasarla a un matraz volumétrico de 100 ml y llevar a volumen con la mezcla de solventes. Concentración de la solución: 36 µg/ml.

Formulación II, III y IV: Pesar exactamente 40 mg de clorhidrato de verapamilo y colocarlos en un matraz volumétrico de 50 ml, disolverlos con aprox. 30 - 35 ml de la mezcla de solventes y llevar a volumen con la misma solución. Tomar 3 ml y pasarlos a un matraz volumétrico de 100 ml y llevar a volumen con la mezcla de solventes. Concentración de la solución: 24 µg/ml.

Medir las absorbancias de las soluciones problema y estándar en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 279 nm.

Calcular el contenido en porcentaje del principio activo (R), de la siguiente manera:

$$R = \frac{A_p \text{ Cstd}}{A_{std} \text{ Cp}} \times 100 \%$$

NOTAS:

1. Usar mezcla de solventes recién preparada.
2. Usar Metanol Merck o Mallinckrodt.
3. Triturar completamente la muestra ya que de lo contrario, se dificultaría la extracción del principio activo.
4. No esperar a que se filtre toda la solución, ya que esto lleva tiempo y se evapora el metanol perdiéndose la proporción de los solventes de la mezcla.
5. Una vez preparada la dilución, es conveniente medir la absorbancia lo antes posible.

D. PARAMETROS DE VALIDACION.

1. LINEARIDAD DEL SISTEMA.

Se determinó construyendo una curva de calibración, Concentración Vs Absorbancia utilizando seis diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo el análisis espectrofotométrico por duplicado para cada dilución.

El intervalo de concentraciones analizado incluyó soluciones al 40%, 60, 80, 100, 120 y 150% de clorhidrato de verapamilo (Concentraciones: 12, 18, 24, 30, 36 y 45 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente).

2. PRECISION DEL SISTEMA.

Se determinó por el análisis sextuplicado de la misma solución estándar correspondiente al 100 % establecido en la Linearidad del Sistema (Concentración: 30 $\mu\text{g/ml}$).

3. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA.

Se determinó por medio de la comparación de los resultados de los análisis iniciales de las soluciones empleadas para determinar la precisión del sistema, con los resultados obtenidos de las mismas muestras después de permanecer durante 2 y 24 horas en diferentes condiciones: en ausencia y en presencia de luz, en refrigeración y a temperatura ambiente; 3 muestras se almacenaron en recipiente transparente y las otras 3 en ambar.

4. LINEARIDAD DEL METODO.

Se determinó a partir de placebos de cada formulación adicionados de cinco cantidades diferentes de clorhidrato de verapamilo, cada una de manera independiente y haciendo los análisis por triplicado, el mismo analista y bajo las mismas condiciones de operación.

Para la formulación I, (tabletas - 180 mg de activo), las cantidades adicionadas y analizadas con el método analítico propuesto fueron aproximadamente de 108, 144, 180, 216 y 252 mg, equivalentes al 60, 80, 100, 120 y 140 % respectivamente de la cantidad correspondiente al 100 % del activo en el producto farmacéutico.

Para la formulación II, (tabletas - 120 mg de activo), las cantidades adicionadas y analizadas con el método analítico propuesto fueron aproximadamente de 72, 96, 120, 144 y 168 mg, equivalentes al 60, 80, 100, 120 y 140 % respectivamente, de la cantidad correspondiente al 100% de activo en el producto farmacéutico.

Para las formulaciones III y IV (grageas - 80 y 40 mg de activo respectivamente), las cantidades adicionadas y analizadas con el método analítico propuesto fueron aproximadamente de 48, 64, 80, 96 y 112 mg, equivalentes al 60, 80, 100, 120 y 140 % respectivamente, de la cantidad correspondiente al 100 % de activo en el producto farmacéutico.

Las concentraciones de las soluciones finales a analizar, estuvieron dentro del intervalo de la Linearidad del Sistema y fueron las siguientes:

- Formulación I: 21.6, 28.8, 36.0*, 43.2 y 50.4 µg/ml.

- Formulación II, III y IV: 14.4, 19.2, 24.0*, 28.8 y 33.6 µg/ml.

Se obtuvo la cantidad de activo recuperada para construir una gráfica de "Cantidad adicionada Vs Cantidad recuperada".

Se recurrió al análisis de Regresión Lineal y al estadístico para determinar el dictámen de validación de acuerdo a los criterios de aceptación establecidos.

* Concentración final correspondiente al 100 % de activo en el producto farmacéutico.

5. EXACTITUD DEL METODO.

Se determinó analizando 6 placebos de cada formulación cargados de manera independiente con el clorhidrato de verapamilo. El análisis se hizo en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

La concentración final analizada en la formulación I fué de 36.0 $\mu\text{g/ml}$ y en las formulaciones II, III y IV correspondió a 24.0 $\mu\text{g/ml}$.

6. PRECISION DEL METODO.

Repetibilidad y Reproducibilidad del Método.

Se determinó de una muestra homogénea de cada formulación cuya cantidad teórica del principio activo es aproximadamente el 100 %. Lo analizaron dos analistas en dos días diferentes y por triplicado. Se preparó una solución estándar de clorhidrato de verapamilo con una concentración final igual a la del producto terminado.

Formulación I. No. Lote: 10092. Concentración final: Aproximadamente 36.0 $\mu\text{g/ml}$.

Formulación II, III y IV. Nos. lote: 16292, 9992 y 26592 respectivamente con una concentración final de la solución de: aproximadamente 24.0 $\mu\text{g/ml}$.

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis estadístico (análisis de varianza) para poder compararlos con los criterios de aceptación establecidos y así determinar el dictámen de validación.

7. ESPECIFICIDAD.

Se determinó empleando el método analítico propuesto de la siguiente manera:

- a. Análisis de una solución estándar de clorhidrato de verapamilo.
- b. Análisis de placebos de cada formulación.
- c. Análisis del producto terminado de cada formulación.

8. TOLERANCIA.

Se determinó de una muestra homogénea de cada formulación empleando el método analítico propuesto y haciendo el análisis por triplicado variando la proporción de los solventes que constituyen el disolvente de la muestra.

Proporciones evaluadas:

Metanol:	HCl	0.1 N
8.0 :	2.0	
9.5 :	0.5	

E. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

1. Se degradó el clorhidrato de verapamilo dejándolo en Peróxido de Hidrógeno al 30 % durante ocho días.

2. Se preparó una placa comparativa (10 X 10 cm) de la siguiente manera:

Principio activo en CHCl_3 a una concentración de $8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Volúmen de aplicación: $225 \mu\text{l}$

Cantidad de estándar: $1\ 800 \mu\text{g}$

Principio activo degradado en H_2O_2 a una concentración de $4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Volumen de aplicación: $450 \mu\text{l}$

Cantidad de estándar degradado: $1800 \mu\text{g}$

Fase móvil:

Tolueno: Metanol: Acetona: Acido acético glacial
(50:40:5:5)

Frente del disolvente: 7.5 cm

Tiempo de elución: Aprox. 30 - 45 minutos

Revelador: - Luz U.V. (252 nm)
- Cloruro de hierro(II)-Yodo

3. También se hizo una placa preparativa (10 X 20 cm) en la cual se aplicaron: Clorhidrato de verapamilo en cloroformo, en peróxido de hidrógeno y se dejó una banda como blanco.

Concentración en CHCl_3 = 8 mg/ml

Volumen de aplicación: 2 ml

Cantidad aplicada: 16 mg

Concentración en H_2O_2 = 4 mg/ml

Volumen de aplicación: 4 ml

Cantidad aplicada: 16 mg

Fase móvil: Misma que la de la placa comparativa

Frente del disolvente: 15 cm

Tiempo de elución: Aprox. 75 - 90 minutos

Revelador: - Luz U.V.

A partir de la placa preparativa, se recuperó el clorhidrato de verapamilo, el producto de degradación y la banda correspondiente al blanco. Después del procedimiento necesario se analizaron las muestras en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 279 nm para cuantificar al clorhidrato de verapamilo en presencia de su producto de degradación.

C A P I T U L O I I I

R E S U L T A D O S

A. PARAMETROS DE VALIDACION.

LINEARIDAD DEL SISTEMA.

En la tabla No. 1 se presentan los datos de la curva de calibración del clorhidrato de verapamilo por espectrofotometría U.V. a 279 nm empleando como disolvente una mezcla de Metanol: HCl 0.1N (9:1). La representación gráfica se muestra en la gráfica No. 1.

Tabla No. 1

C o n c e n t r a c i ó n		Absorbancia	Factor Abs/Conc.
%	µg/ml		
40	12	0.144	0.0120
40	12	0.145	0.0120
60	18	0.216	0.0120
60	18	0.218	0.0121
80	24	0.291	0.0121
80	24	0.292	0.0121
100	30	0.368	0.0122
100	30	0.370	0.0123
120	36	0.439	0.0121
120	36	0.440	0.0122
150	45	0.551	0.0122
150	45	0.551	0.0122

Resultados:

$r = 0.9999$
 $r^2 = 0.9998$
 $b = -0.0040$
 $CV = 0.8 \%$

Criterios de aceptación:

$r \geq 0.99$
 $r^2 \geq 0.98$
 $b \neq 0$
 $CV \leq 1.5 \%$

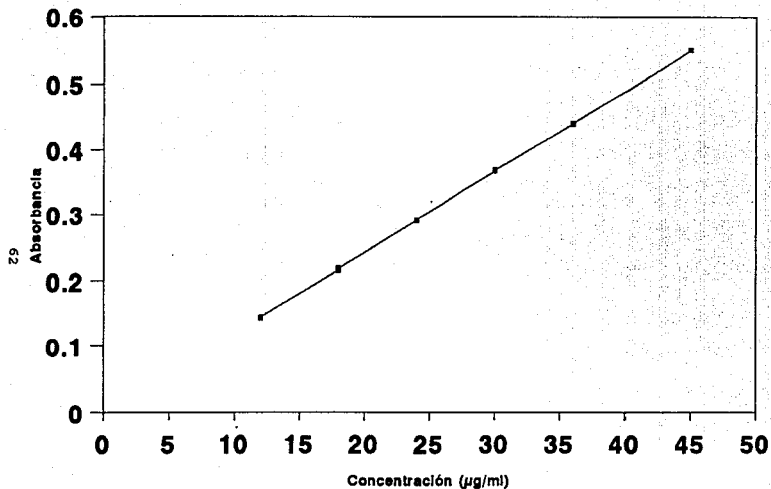
DICTAMEN: Ya que $r > 0.99$; $r^2 > 0.98$ y $CV < 1.5\%$, se cumple con los criterios para la linealidad del sistema. El sistema es lineal dentro del intervalo de concentraciones analizado (12 - 45 µg/ml).

PRECISION DEL SISTEMA.

Los resultados del análisis de una misma solución estándar correspondiente al 100 % de la concentración de clorhidrato de verapamilo establecido en la Linealidad del sistema, se muestran en la tabla No. 2.

LINEARIDAD DEL SISTEMA

Clorhidrato de verapamilo



Gráfica No. 1

$$r = 0.9999 \quad m = 0.0123 \quad b = -0.0040$$

Tabla No. 2.

Solución	$A_{279 \text{ nm}}$
1	0.369
2	0.371
3	0.369
4	0.370
5	0.369
6	0.368

Resultado:

Criterio de aceptación:

CV = 0.3 %

CV \leq 1.5 %

DICTAMEN: Ya que el CV < 1.5 %, se cumple con el criterio para la precisión del sistema. El sistema es preciso.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA.

Se utilizaron las mismas soluciones con las que se determinó la precisión del sistema sometiéndolas a diferentes condiciones de almacenamiento. En la tabla No. 3 se muestran los resultados de esta prueba.

Tabla No. 3

P o r c i e n t o d e R e c o b r o		
Solución	2 h	24 h
5 ° C		
1	100.81	99.72
2	100.61	100.53
T. A.		
3	99.18	99.45
4	99.45	100.54
T. A. + L u z		
5	99.45	99.45
6	100.00	99.45

NOTA: Las muestras 1, 3 y 5 se almacenaron en recipiente transparente y las muestras 2, 4 y 6 en ambar.

Resultados:**Criterio de aceptación:**

$\bar{I}_{2h} = 100.1 \%$

$\bar{I} = 97.0 - 103.0 \%$

$\bar{I}_{24h} = 99.9 \%$

DICTAMEN: La muestra analítica es estable en condiciones de refrigeración, en ausencia o en presencia de luz a T. A. por lo menos durante 24 horas después de su preparación, ya que el valor de la media para el factor I se encuentra entre el 97.0 y el 103.0 %.

FORMULACION I - 180 mg P.A.**LINEARIDAD DEL METODO.**

En la tabla No. 4 se presentan los datos de mg recuperados y % de recobro para obtener la linealidad del método. La representación gráfica se muestra en la gráfica No. 2.

Tabla No. 4

Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	R
108.3	109.77	101.35
108.0	107.22	99.27
108.1	109.82	101.59
144.2	146.56	101.63
144.1	144.22	100.08
144.0	144.65	100.45
180.0 *	181.42	100.78
180.0	181.82	101.01
180.1	182.86	101.53
216.0	216.88	100.40
216.1	217.20	100.50
216.1	214.42	99.22
252.2	254.60	100.95
252.2	252.16	99.98
252.2	253.95	100.69

* Concentración final: 36 µg/ml.

Resultados:**Criterios de aceptación:**

$r = 0.9999$

$r \geq 0.99$

$r^2 = 0.9998$

$r^2 \geq 0.98$

$m = 1.0010$

$m \leq 1$

$b = 1.5126$

$b \neq 0$

$$\bar{R} = 100.6 \%$$
$$CV = 0.7 \%$$

$$\bar{R} = 97.0 - 103.0 \%$$
$$CV \leq 3.0 \%$$

DICTAMEN: Ya que $r^2 > 0.98$, $m = 1$, \bar{R} está dentro del 97.0 - 103.0 % y el $CV < 3.0 \%$, el método para la determinación del clorhidrato de verapamilo contenido en la formulación I es lineal dentro del intervalo de concentraciones analizado (21.6 - 50.4 $\mu\text{g/ml}$).

EXACTITUD DEL METODO.

En la tabla No. 5 se presentan los resultados de % recuperado de clorhidrato de verapamilo a partir de su determinación de placebos cargados.

Tabla No. 5

R
101.7
101.5
101.7
100.8
100.7
99.1

Resultados:

$$\bar{R} = 100.9 \%$$
$$CV = 1.0 \%$$

Criterios de aceptación:

$$\bar{R} = 97.0 - 103.0 \%$$
$$CV \leq 3.0 \%$$

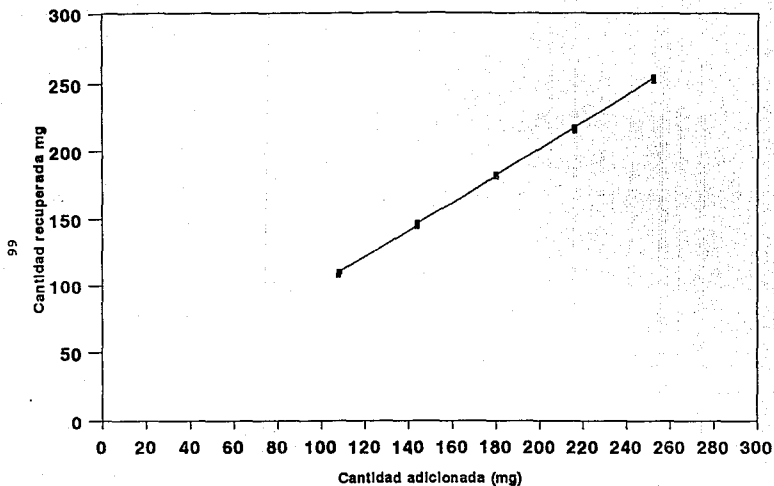
DICTAMEN: Debido a que el \bar{R} se encuentra entre 97.0 - 103.0 % y el $CV < 3.0 \%$, el método para la determinación del principio activo contenido en la formulación I es exacto.

PRECISION DEL METODO (REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD).

En la tabla No. 6 se muestran los resultados de % de recobro obtenidos por 2 analistas, 2 días y 3 determinaciones cada vez, analizando el producto terminado, lote No. 10092.

LINEARIDAD DEL METODO

Formulación I



→ Gráfica No. 2

$$r = 0.9997 \quad m = 1.0005 \quad b = 0.9663$$

Tabla No. 6
A N A L I S T A

D		1	2
I	1	100.00	98.39
		99.77	98.16
		99.54	100.23
A	2	98.17	100.90
		100.00	100.23
		99.77	100.69

Resultados:

Criterios de aceptación:

$\bar{R} = 99.65 \%$
CV = 0.9 %

$\bar{R} = 97.0 - 103.0 \%$
CV \leq 3.0 %

DICTAMEN: Como CV < 3.0 % y el \bar{R} se encuentra entre 97.0 - 103 %, el método analítico es preciso para determinar al principio activo en el formulación I.

PRUEBA ESTADÍSTICA PARA LA REPRODUCIBILIDAD DEL METODO. Los resultados del análisis de varianza se presentan en la tabla No. 7.

Tabla No. 7

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	Fcal.	F*tab.
Analista	gla = 1	SCa = 0.1519	MCa = 0.1519	Fa = 0.0668	gla 38.51
Día	gld = 2	SCd = 4.5464	MCd = 2.2732	Fd = 3.7095	Fgld 6.06
Error	gle = 8	SCe = 4.9024	MCE = 0.6128	-----	-----

Fcal. = F calculada.

F*tab. = F de tablas.

INTERPRETACION DE RESULTADOS:

Como Fa < Fgla, el método analítico es reproducible por los analistas.

Como Fd < Fgld, el método analítico es reproducible en diferentes días por un mismo analista.

REPETIBILIDAD DEL METODO ANALITICO.

Repetibilidad = $\pm (MCE)^{1/2}$
 Repetibilidad = ± 0.7828

COEFICIENTE DE VARIACION TOTAL.

CV = 0.9 %

Por los resultados anteriores, puede decirse que el método analítico para determinar al principio activo en la formulación I, es reproducible y repetible por 2 analistas y en días diferentes.

FORMULACION II - 120 mg P.A.**LINEARIDAD DEL METODO.**

En la tabla No. 8 se presentan los datos de mg recuperados y % de recobro para obtener la linealidad del método. La representación gráfica se muestra en la gráfica No. 3.

Tabla No. 8

Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	R
72.2	71.72	99.33
72.0	72.83	101.15
72.0	72.41	100.56
96.0	95.75	99.73
95.8	97.03	101.28
96.1	96.31	100.21
120.2	121.03	100.69
120.1	121.95	101.54
120.0 *	120.83	100.69
144.1	142.91	99.17
144.1	144.73	100.43
144.0	144.82	100.56
168.2	170.75	101.51
168.0	170.07	101.23
168.0	170.07	101.23

* Concentración final: 24 $\mu\text{g/ml}$.

Resultados:

$r = 0.9996$
 $r^2 = 0.9993$

Criterios de aceptación:

$r \geq 0.99$
 $r^2 \geq 0.98$

$$m = 1.0151$$

$$b = -0.9923$$

$$m = 1$$

$$b = 0$$

$$\bar{R} = 100.6 \%$$

$$CV = 0.7 \%$$

$$\bar{R} = 97.0 - 103.0 \%$$

$$CV \leq 3.0 \%$$

DICTAMEN: Ya que $r^2 > 0.98$, \bar{R} está dentro del 97.0 - 103.0 % y el $CV < 3.0 \%$, el método para la determinación del clorhidrato de verapamilo presente en la formulación II, es lineal dentro del intervalo de concentraciones analizado (14.4 - 33.6 $\mu\text{g/ml}$).

EXACTITUD DEL METODO.

En la tabla No. 9 se muestran los resultados de % recuperado de clorhidrato de verapamilo a partir de su determinación de placebos cargados.

Tabla No. 9

R
102.2
100.7
102.2
102.0
101.9
102.0

Resultados:

$$\bar{R} = 101.8 \%$$

$$CV = 0.6 \%$$

Criterios de aceptación:

$$\bar{R} = 97.0 - 103.0 \%$$

$$CV \leq 3.0 \%$$

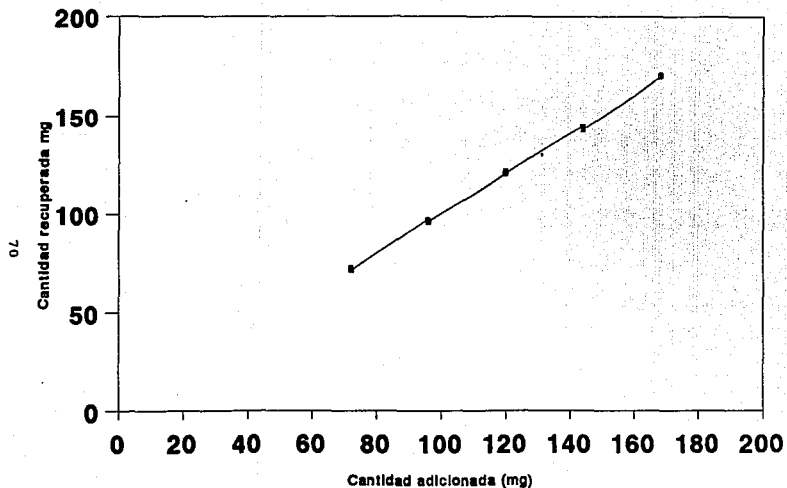
DICTAMEN: Como el \bar{R} se encuentra entre el 97.0 - 103.0 % y el $CV < 3.0 \%$, el método es exacto para determinar al principio activo de la formulación II.

PRECISION DEL METODO (REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD).

En la tabla No. 10 se muestran los resultados de % de recobro obtenidos por 2 analistas, 2 días y 3 determinaciones cada vez, analizando el producto terminado, lote No. 12692

LINEARIDAD DEL METODO

Formulación II



—• Gráfica No. 3

$r = 0.9996$ $m = 1.0151$ $b = -0.9923$

Tabla No. 10
A N A L I S T A

D		1	2
I	1	99.68	101.01
		100.35	100.67
		100.35	100.67
A	2	100.34	100.67
		100.34	100.67
		99.68	100.34
S			

Resultados:

Criterios de aceptación:

$\bar{R} = 100.4 \%$
CV = 0.4 %

$\bar{R} = 97.0 - 103.0 \%$
CV < 3.0 %

DICTAMEN: Como CV < 3.0 % y el \bar{R} se encuentra entre el 97.0 - 103.0 %, el método es preciso para la determinación del clorhidrato de verapamilo en la formulación II.

PRUEBA ESTADISTICA PARA LA REPRODUCIBILIDAD DEL METODO. Los resultados del análisis de varianza se presentan en la tabla No. 11.

Tabla No. 11

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	Fcal.	F*tab.
Analista	gla = 1	SCa = 0.9020	MCa = 0.9020	Fa = 24.0911	Fgla = 38.51
Día	gld = 2	SCd = 0.0749	Mcd = 0.0374	Fd = 0.4051	Fgld = 6.06
Error	gle = 8	SCe = 0.7393	Mce = 0.0924	-----	-----

Fcal. = F calculada

F*tab. = F de tablas.

INTERPRETACION DE RESULTADOS:

Como Fa < Fgla, el método analítico es reproducible por los analistas.

Como $F_d < F_{gld}$, el método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

REPETIBILIDAD DEL METODO.

Repetibilidad = $\pm (M_{Ce})^{1/2}$

Repetibilidad = ± 0.3040

COEFICIENTE DE VARIACION TOTAL.

CV = 0.4 %

Por los resultados anteriores, puede decirse que el método analítico para determinar al principio activo en la formulación II, es reproducible y repetible por 2 analistas y en días diferentes.

FORMULACION III - 80 mg P.A.

LINEARIDAD DEL METODO.

En la tabla No. 12 se presentan los datos de mg recuperados y % de recobro para obtener la linealidad del método. La representación gráfica se muestra en la gráfica No. 4.

Tabla No. 12

Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	R
47.6	47.79	100.39
48.2	48.76	101.16
48.1	47.74	99.25
64.0	64.38	100.59
64.1	64.82	101.12
63.9	64.20	100.46
80.1	79.62	99.40
80.2	80.89	100.86
80.0 *	80.00	100.00
96.0	96.98	101.02
96.1	96.61	100.53
96.2	96.78	100.60
111.8	112.52	100.64
112.2	112.39	100.16
112.2	112.67	100.41

* Concentración final: 24 $\mu\text{g/ml}$.

Resultados:

$$r = 0.9998$$

$$r^2 = 0.9997$$

$$m = 1.0055$$

$$b = -0.0772$$

$$\bar{R} = 100.44 \%$$

$$CV = 0.5 \%$$

Criterios de aceptación:

$$r \geq 0.99$$

$$r^2 \geq 0.98$$

$$m \approx 1$$

$$b \approx 0$$

$$\bar{R} = 97.0 - 103.0 \%$$

$$CV \leq 3.0 \%$$

DICTAMEN: Ya que $r^2 > 0.98$, $m \approx 1$, \bar{R} está dentro del 97.0 - 103 % y el $CV > 3.0 \%$, por lo que el método es linal dentro del intervalo de concentraciones analizado (14.4 - 33.6 $\mu\text{g/ml}$).

EXACTITUD DEL METODO.

En la tabla No. 13 se muestran los resultados de % recuperado de clorhidrato de verapamilo a partir de su determinación de placebos cargados.

Tabla No. 13

R
102.1
100.2
101.1
101.1
101.4

Resultados:

$$\bar{R} = 101.2 \%$$

$$CV = 0.6 \%$$

Criterios de aceptación:

$$\bar{R} = 97.0 - 103.0 \%$$

$$CV \leq 3.0 \%$$

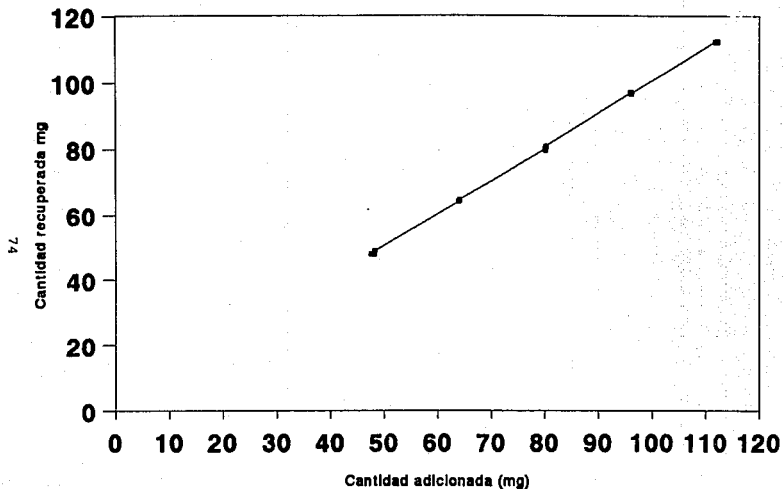
DICTAMEN: Dado que el \bar{R} se encuentra el 97.0 - 103 % y el $CV < 3.0 \%$, el método para la determinación del principio activo en la formulación III es exacto.

PRECISION DEL METODO (REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD).

En la tabla No. 14 se muestran los resultados de % de recobro obtenidos por 2 analistas, 2 días y 3 determinaciones cada vez, analizando el producto terminado, lote No. 9992.

LINEARIDAD DEL METODO

Formulación III



Gráfica No. 4

$$r = 0.9998 \quad m = 1.0055 \quad b = -0.0772$$

Tabla No. 14
A N A L I S T A

		1	2
D		100.25	101.69
		101.27	98.65
I	1	100.68	101.01
A		99.65	99.65
		100.69	101.01
S	2	100.69	100.70

Resultados:

R = 100.49
CV = 0.8 %

Criterios de aceptación:

R = 97.0 - 103 %
CV ≤ 3.0 %

DICTAMEN: Como CV < 3.0 % y el \bar{R} se encuentra entre 97.0 - 103.0 %, el método analítico es preciso para determinar al clorhidrato de verapamilo en la formulación III.

PRUEBA ESTADISTICA PARA LA REPRODUCIBILIDAD DEL METODO. Los resultados del análisis de varianza se presentan en la tabla No. 15.

Tabla No. 15

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	Fcal.	F*tab.
Analista	gla = 1	SCa = 0.0225	MCa = 0.0225	Fa = 0.1975	Fgla 38.51
Día	gld = 2	SCd = 0.2282	MCd = 0.1141	Fd = 0.1241	Fgld 6.06
Error	gle = 8	SCe = 7.3528	MCe = 0.9191	-----	-----

Fcal. = F calculada.

F*tab. = F de tablas.

INTERPRETACION DE RESULTADOS:

Como Fa < Fgla, el método analítico es reproducible por los analistas.

Como Fd < Fgld, el método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

REPETIBILIDAD DEL METODO ANALITICO.

Repetibilidad = $\pm (MCE)^{1/2}$

Repetibilidad = ± 0.9587

COEFICIENTE DE VARIACION TOTAL.

CV = 0.8 %

Por los resultados anteriores, puede decirse que el método analítico para determinar al principio activo en la formulación III, es reproducible y repetible por 2 analistas y en días diferentes.

FORMULACION IV - 40 mg P.A.

LINEARIDAD DEL METODO.

En la tabla No. 16 se presentan los datos de mg recuperados y % de recobro para obtener la Linearidad del método. La representación gráfica se muestra en la gráfica No. 5.

Tabla No. 16

Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	R
47.9	47.65	99.47
48.2	47.74	99.04
48.0	48.60	101.25
63.9	64.43	100.82
64.2	63.63	99.11
63.9	64.53	100.98
80.0 *	80.27	100.33
80.1	79.62	99.40
79.9	80.64	100.92
96.1	96.66	100.58
96.1	96.05	99.94
96.0	95.83	99.82
112.2	113.06	100.76
112.2	112.67	100.41
112.1	112.11	100.00

* Concentración final: 24 μ g/ml.

Resultados:

$r = 0.9998$
 $r^2 = 0.9996$

Criterios de aceptación:

$r \geq 0.99$
 $r^2 \geq 0.98$

$$m = 1.0054$$

$$b = -0.2582$$

$$m \approx 1$$

$$b \approx 0$$

$$\bar{R} = 100.19 \%$$

$$CV = 0.7 \%$$

$$\bar{R} = 97.0 - 103 \%$$

$$CV \leq 3.0 \%$$

DICTAMEN: Ya que $r^2 > 0.98$, $m = 1$, \bar{R} está dentro del 97-103 % y el $CV < 3.0 \%$, el método para la determinación del clorhidrato de verapamilo es lineal dentro del intervalo de concentraciones analizado (14.4 - 33.6 $\mu\text{g/ml}$).

EXACTITUD DEL METODO.

En la tabla No. 17 se muestran los resultados de % recuperado de clorhidrato de verapamilo a partir de su determinación de placebos cargados.

Tabla No. 17

R
98.5
100.7
101.3
101.5
101.9
101.3

Resultados:

$$\bar{R} = 100.9 \%$$

$$CV = 1.2 \%$$

Criterios de aceptación:

$$\bar{R} = 97.0 - 103.0 \%$$

$$CV \leq 3.0 \%$$

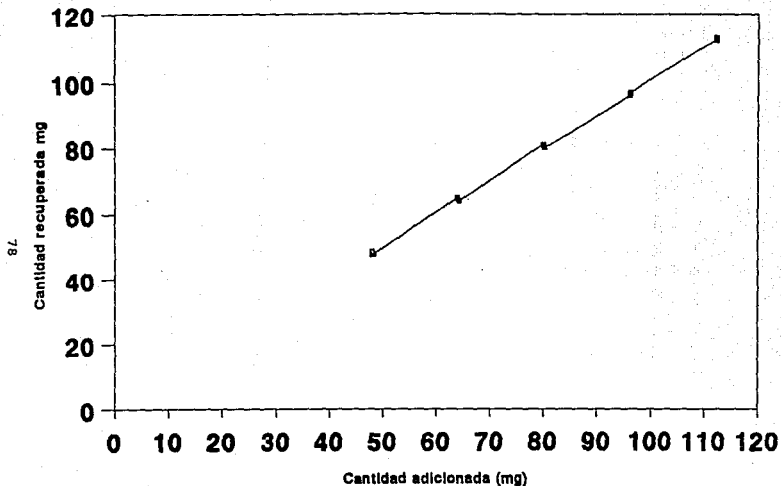
DICTAMEN: Ya que el \bar{R} se encuentra entre el 97.0 - 103.0 % y el $CV < 3.0 \%$, el método para la determinación del clorhidrato de verapamilo en la formulación IV es exacto.

PRECISION DEL METODO (REPRODUCIBILIDAD Y REPETIBILIDAD).

En la tabla No. 18 se muestran los resultados de % de recobro obtenidos por 2 analistas, 2 días y 3 determinaciones cada vez, analizando el producto terminado, lote No. 26592.

LINEARIDAD DEL METODO

Formulación IV



Gráfica No. 5

$r = 0.9998$ $m = 1.0054$ $b = -0.2582$

Tabla No. 18

A N A L I S T A

D		1	2
I	1	98.96	98.28
		98.62	98.62
		98.27	98.62
A	2	97.90	99.32
		97.20	98.97
		98.60	98.97

Resultados:

Criterios de aceptación:

$\bar{R} = 98.53$
CV = 0.6 %

$\bar{R} = 97.0 - 103 \%$
CV $\leq 3.0 \%$

DICTAMEN: Como CV $< 3.0 \%$ y el \bar{R} se encuentra entre el 97.0 - 103 %, el método analítico es preciso para determinar al principio activo presente en la formulación IV.

PRUEBA ESTADISTICA PARA LA REPRODUCIBILIDAD DEL METODO. Los resultados del análisis de varianza se presentan en la tabla No. 19.

Tabla No. 19

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	Fcal.	F*tab.
Analista	gla = 1	SCa = 0.8651	MCa = 0.8651	Fa = 1.3603	Fgla 38.51
Día	gld = 2	SCd = 1.2719	MCd = 0.6359	Fd = 3.6966	Fgld 6.06
Error	gle = 8	SCe = 1.3763	MCe = 0.1720	-----	----

Fcal. = F calculada.

F*tab. = F de tablas.

INTERPRETACION DE RESULTADOS:

Como Fa $<$ Fgla, el método analítico es reproducible por los analistas.

Como Fd $<$ Fgld, el método analítico es reproducible en diferentes días por un mismo analista.

REPETIBILIDAD DEL METODO ANALITICO.

Repetibilidad = \pm (MCE)^{1/2}
Repetibilidad = \pm 0.4148

COEFICIENTE DE VARIACION TOTAL.

CV = 0.6 %

Por los resultados anteriores, puede decirse que el método analítico para determinar al principio activo en la formulación IV, es reproducible y repetible por 2 analistas y en días diferentes.

ESPECIFICIDAD DEL METODO ANALITICO.

En las figuras No. 1 y No. 2 se muestra el espectro de absorción U.V. del clorhidrato de verapamilo a una concentración de 36 y de 24 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. En ellos, se observa un máximo de absorción a una longitud de onda de 279 nm.

En las figuras No. 3, No. 4, No. 5 y No. 6 se presenta el espectro de absorción U.V. de placebos de las formulaciones I, II, III y IV respectivamente, en los cuales no se detecta respuesta significativa de los excipientes presentes en las formulaciones.

En las figuras No. 7, No. 8, No. 9 y No. 10 se tienen los espectros de absorción U.V. de los productos terminados de cada formulación (I, lote No. 10092; II, lote No. 12692; III, lote No. 9992 y IV, lote No. 26592 respectivamente), en los que se observa una respuesta en la longitud de onda de máxima absorción, debida a la presencia del principio activo en el producto analizado.

DICTAMEN: El método analítico propuesto es específico con respecto al placebo para determinar al clorhidrato de verapamilo presente en las cuatro formulaciones a analizar.

ESPECIFICIDAD

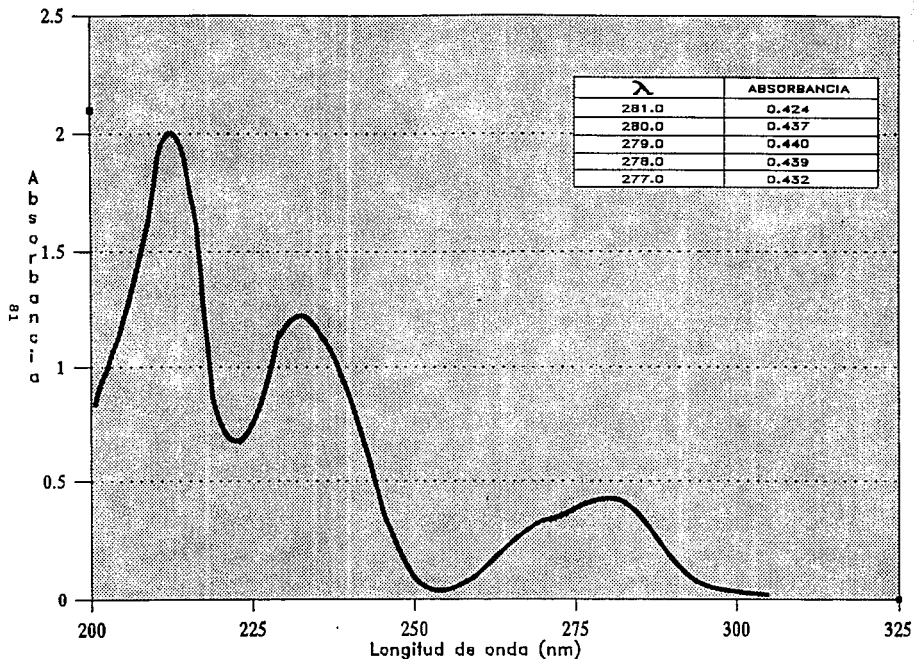


FIG. 1. Espectro de absorción U.V. del clorhidrato de verapamilo a una concentración de 36 $\mu\text{g/ml}$.

ESPECIFICIDAD

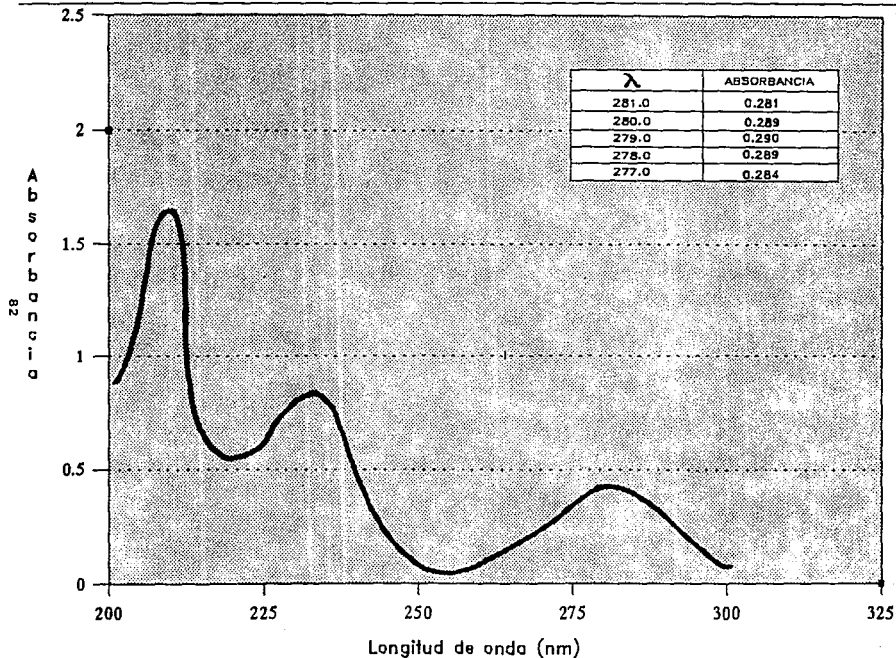


FIG. 2. Espectro de absorción U.V. del clorhidrato de verapamilo a una concentración de 24 $\mu\text{g/ml}$.

ESPECIFICIDAD

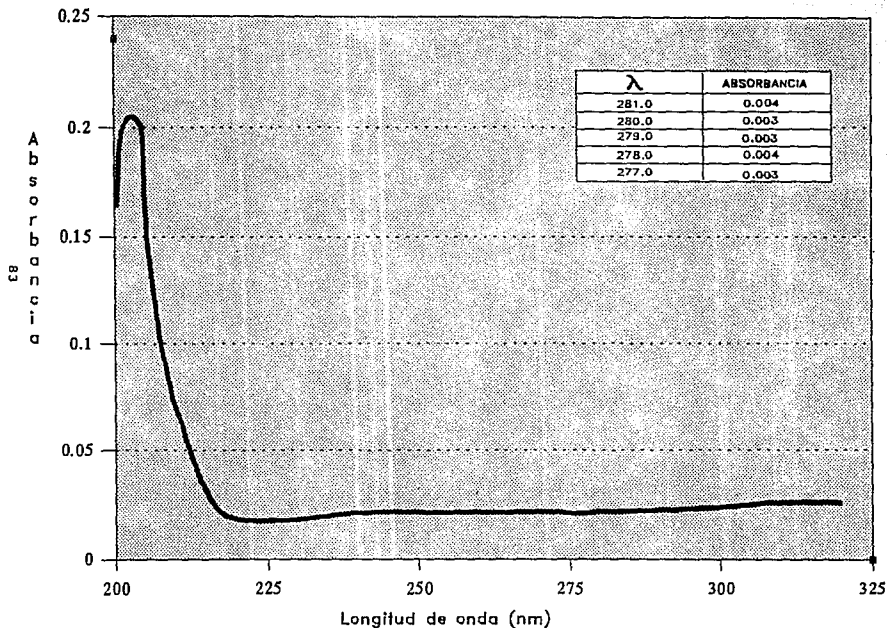


FIG. 3. Espectro de absorción U.V. de placebo de la formulación I.

ESPECIFICIDAD

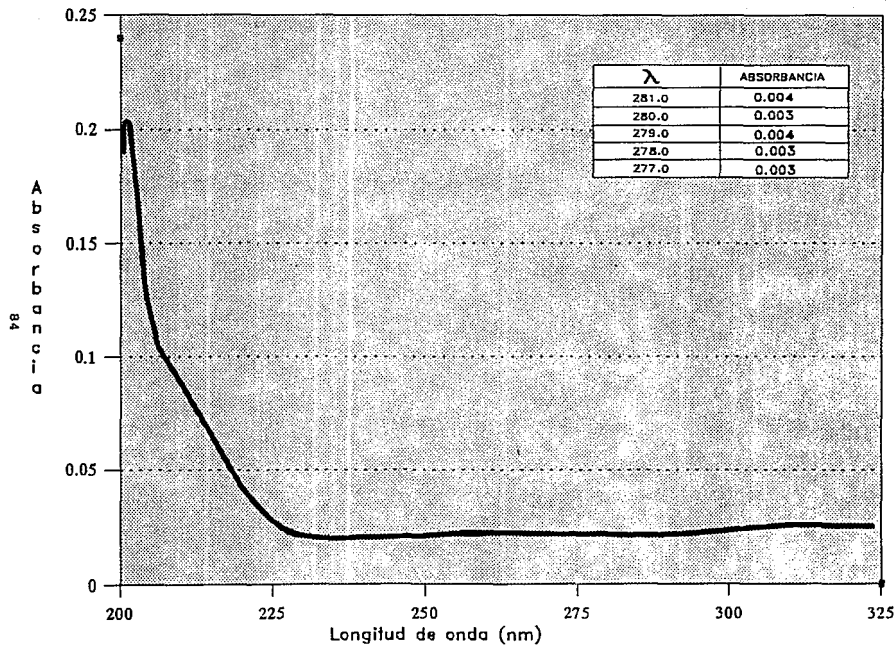


FIG. 4. Espectro de absorción U.V. de placebo de la formulación II.

ESPECIFICIDAD

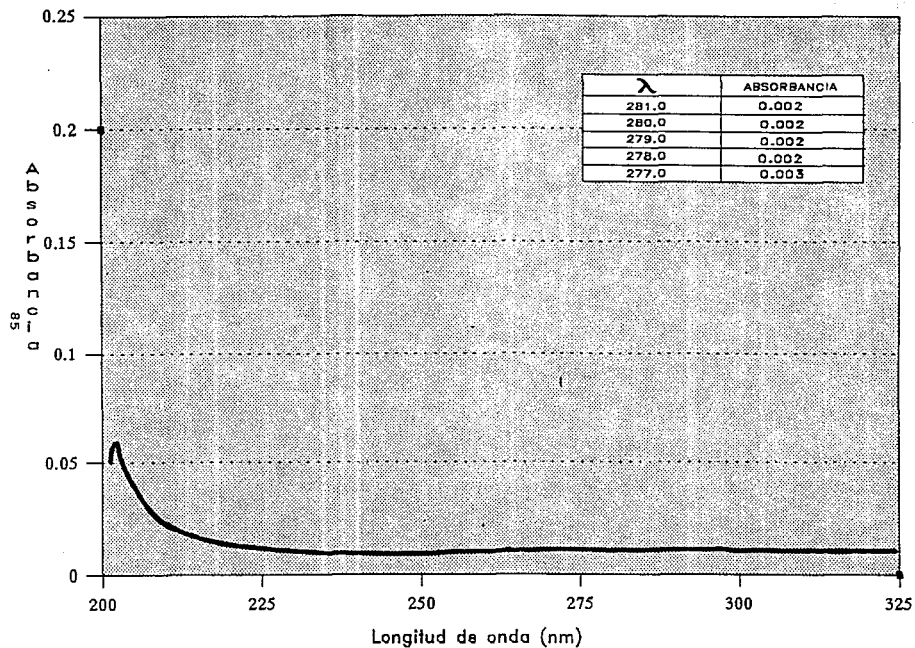


FIG. 5. Espectro de absorción U.V. de placebo de la formulación III.

ESPECIFICIDAD

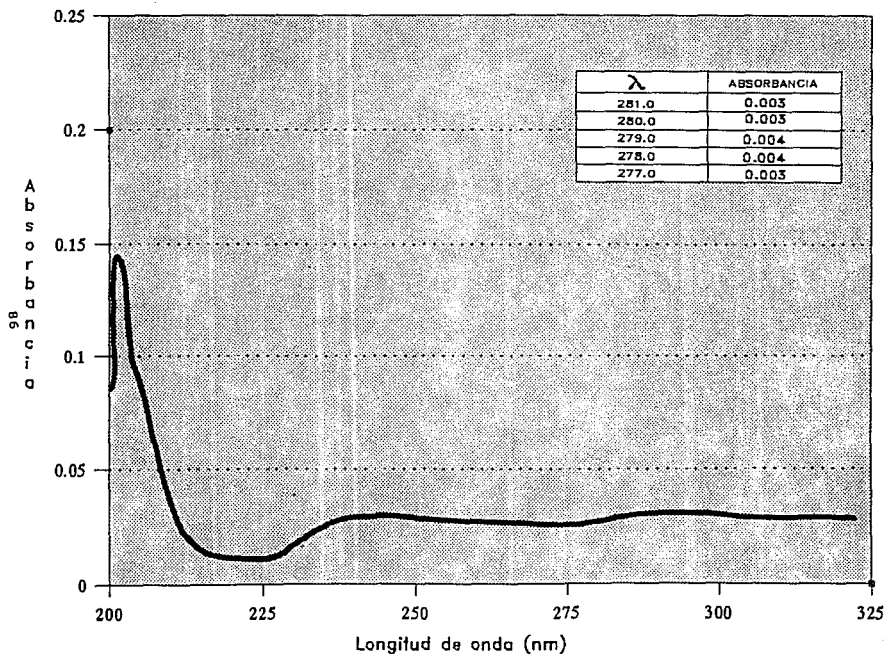


FIG. 6. Espectro de absorción U.V. de placebo de la formulación IV.

ESPECIFICIDAD

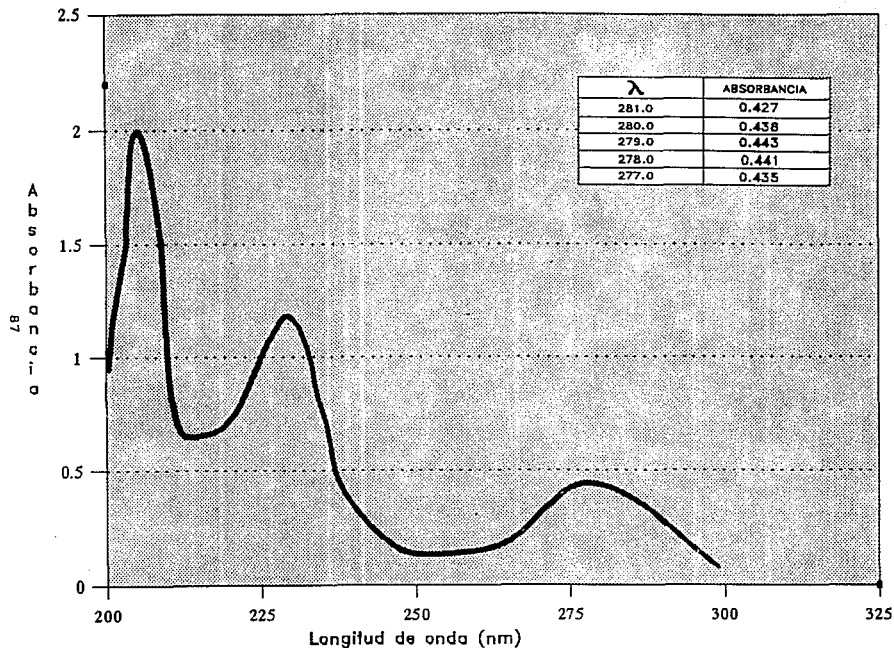


FIG. 7. Espectro de absorción U.V. del producto terminado de la formulación I, Lote:10092.

ESPECIFICIDAD

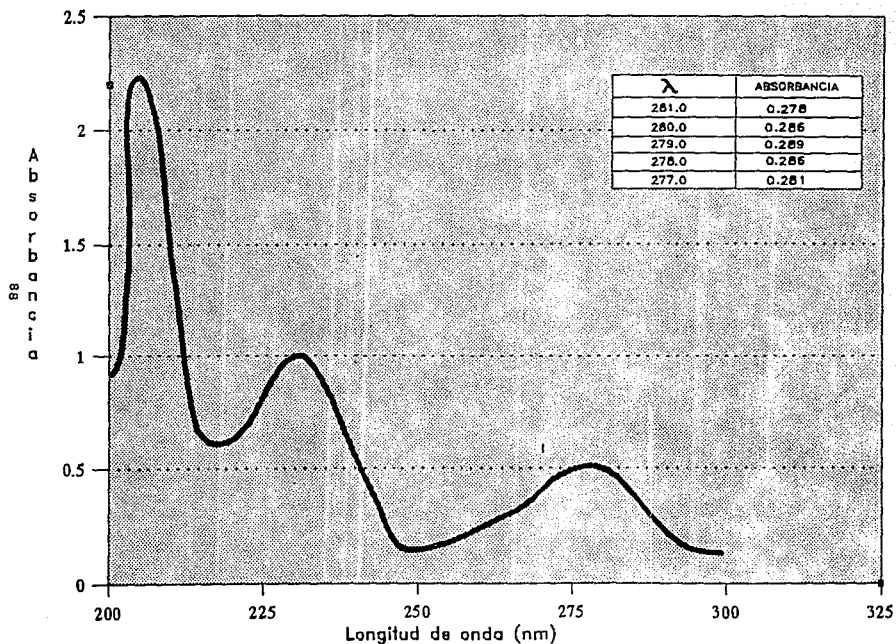


FIG. 8. Espectro de absorción U.V. del producto terminado de la formulación II, Lote:12692.

ESPECIFICIDAD

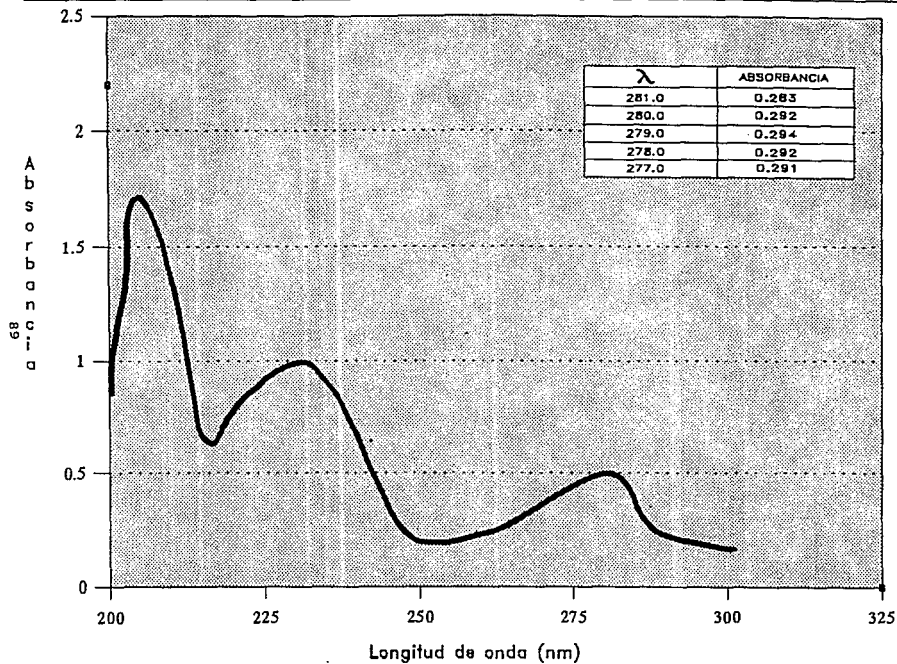


FIG. 9. Espectro de absorción U.V. del producto terminado de la formulación III, Lote: 9992.

ESPECIFICIDAD

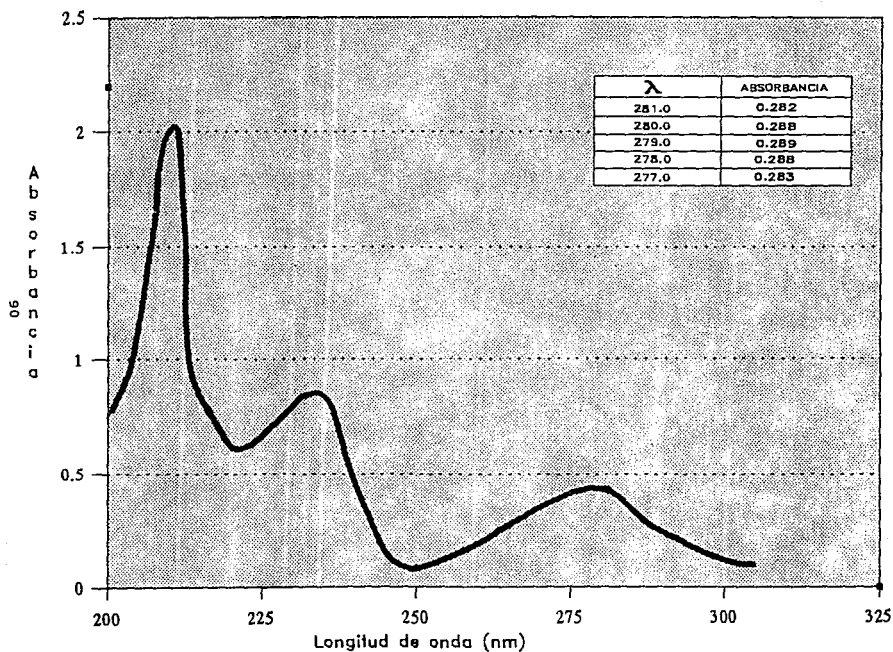


FIG. 10. Espectro de absorción U.V. del producto terminado de la formulación IV, Lote: 26592.

TOLERANCIA.

En la tabla No. 20 se muestran los resultados obtenidos empleando como disolvente de la muestra la mezcla de solventes en una proporción de Metanol : HCl 0.1 N (8:2).

Tabla No. 20

Formulación	Metanol:HCl 0.1N		CV
	$\bar{R}_{9:1}$	$\bar{R}_{8:2}$	
I	99.65	103.42	2.6
II	100.38	105.47	3.5
III	100.49	107.87	5.0
IV	98.53	95.07	2.5

Criterio de aceptación:

$$\bar{R} = 97.0 - 103.0 \%$$

$$CV < 3.0 \%$$

DICTAMEN: A pesar de que el CV para las formulaciones I y IV esté dentro del criterio de aceptación para método espectrofotométrico, ninguno de los recobros cumple, por lo que puede decirse que el método analítico no acepta la variación de la proporción de los solventes.

En la tabla No. 21 se muestran los resultados obtenidos empleando como disolvente de la muestra la mezcla de solventes en una proporción de Metanol: HCl 0.1 N (9.5 : 0.5).

Tabla No. 21

Formulación	Metanol:HCl 0.1N		CV
	$\bar{R}_{9:1}$	$\bar{R}_{9.5:0.5}$	
I	99.65	101.13	1.0
II	100.38	100.57	0.1
III	100.49	101.44	0.7
IV	98.53	93.17	3.9

Criterio de aceptación:

$$\bar{R} = 97.0 - 103 \%$$

$$CV < 3.0 \%$$

DICTAMEN: Por los resultados anteriores, el método analítico acepta emplear la proporción analizada de la mezcla de solventes en las formulaciones I, II y III, ya que el promedio del porcentaje de recobro se encuentra entre el 97.0 - 103.0% y el CV < 3.0 %. Sin embargo, la formulación IV no acepta dicha proporción puesto que el CV y el promedio del porcentaje de recobro no cumplen con los criterios de aceptación de validación.

B. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

1. En la placa comparativa se detectaron dos manchas, una correspondiente al clorhidrato de verapamilo y la otra a su producto de degradación. El Rf de éstos fué de 0.69 y 0.64 respectivamente.

2. A partir de la placa preparativa, fué posible recuperar al clorhidrato de verapamilo, a su producto de degradación y una zona "blanco" para posteriormente analizarlas espectrofotométricamente contra un estándar, a una longitud de onda de 279 nm.

	A ₂₇₉	R
Estándar	0.577	
Clorhidrato de verapamilo recuperado	0.497	86.13
Producto de degradación	0.094	16.29

Sólo se detectó el 16.29 % de clorhidrato de verapamilo presente en el producto de degradación, con lo que se demuestra que la c.c.f. puede utilizarse como técnica auxiliar para determinar al principio activo en presencia de sustancias relacionadas.

DICTAMEN: Por los resultados anteriores, el método analítico acepta emplear la proporción analizada de la mezcla de solventes en las formulaciones I, II y III, ya que el promedio del porciento de recobro se encuentra entre el 97.0 - 103.0% y el CV < 3.0 %. Sin embargo, la formulación IV no acepta dicha proporción puesto que el CV y el promedio del porciento de recobro no cumplen con los criterios de aceptación de validación.

B. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

1. En la placa comparativa se detectaron dos manchas, una correspondiente al clorhidrato de verapamilo y la otra a su producto de degradación. El Rf de éstos fué de 0.69 y 0.64 respectivamente.

2. A partir de la placa preparativa, fué posible recuperar al clorhidrato de verapamilo, a su producto de degradación y una zona "blanco" para posteriormente analizarlas espectrofotométricamente contra un estándar, a una longitud de onda de 279 nm.

	A ₂₇₉	R
Estándar	0.577	
Clorhidrato de verapamilo recuperado	0.497	86.13
Producto de degradación	0.094	16.29

Sólo se detectó el 16.29 % de clorhidrato de verapamilo presente en el producto de degradación, con lo que se demuestra que la c.c.f. puede utilizarse como técnica auxiliar para determinar al principio activo en presencia de sustancias relacionadas.

C O N C L U S I O N E S

El método utilizado para la determinación del clorhidrato de verapamilo presente en las cuatro diferentes formulaciones analizadas, utiliza la Espectrofotometría U.V. a una longitud de onda de 279 nm. Mediante este trabajo de tesis fué posible:

a. Unificar y optimizar la técnica analítica para cuantificar al principio activo con mayor rapidez, precisión y exactitud.

b. Llevar a cabo la validación del método analítico con el propósito de certificar la validez de los resultados obtenidos. Para ello, fué necesario recurrir al análisis estadístico, el cual contribuyó a garantizar que los resultados presentan una confiabilidad aceptable y determinar de esta manera, si se cumple o no con el criterio de aceptación establecido.

c. Determinar la reproducibilidad del método analítico mediante el análisis de varianza concluyendo que no existen diferencias debidas al analista o al día en que se lleva a cabo dicho análisis.

d. En las cuatro formulaciones el método analítico es:

- Lineal en el rango de concentraciones analizadas

- Exacto

- Repetible y reproducible

- Específico en relación a los excipientes

- Las formulaciones I, II y III satisfacen la prueba de tolerancia si se utiliza como disolvente de la muestra Metanol: HCl 0.1 N en una proporción 9.5 :0.5.

Ninguna formulación satisface la prueba de tolerancia si se utiliza como disolvente de la muestra Metanol: HCl 0.1 N en una proporción 8:2.

e. Utilizar la c.c.f. como técnica auxiliar para determinar al principio activo en presencia de productos de degradación.

B I B L I O G R A F I A

1. ASTRA CHEMICALS. Cardiovascular. Verapamilo.
2. BRITISH PHARMAPOEIA. Her Majesty's Stationary Office. Volume 1. London, 1988. p.p. 594.
3. COMITE DE ELABORACION DE GUIAS OFICIALES DE VALIDACION. Validación de Métodos Analíticos. Secretaría de Salud - Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos. México, 1991. p.p. 1-10, 54.
4. CONACHER, Henry B.S. Validation of Methods Used in Crisis Situations. Journal of the Association of Official Analytical Chemists. Vol. 73 No. 2 p.p. 332-333. 1990.
5. CONNORS, Kenneth A. Curso de Análisis Farmacéutico. Editorial Reverté, S.A. España 1981. p.p. 195-198, 202-209, 219, 239-242, 449-451.
6. CHAPMAN, Kenneth G. A History of Validation in the United States: Part I. Pharmaceutical Technology Vol. 15 No. 10 p.p. 82-96. October 1991.
7. CHAPMAN, Kenneth G. A History of Validation in the United States: Part II. Validation of Computer-Related Systems. Pharmaceutical Technology Vol. 15 No. 11. p.p. 54-62. November 1991.
8. CHAPMAN, Kenneth G. Revalidation. Validation Terminology. Pfizer's Drumbeat Program. Journal of the Parenteral Drug Association. Vol. 34 p.p. 217-233. 1980.
9. DICCIONARIO DE ESPECIALIDADES FARMACEUTICAS. 38a. edición. Ediciones P.L.M. S.A. de C.V. México D.F. 1972. p.p. 365-367.
10. FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS. 5a. edición. Secretaría de Salud. México, 1988. p.p.151-154.
11. FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS. 5a. edición. Secretaría de Salud. México, 1988. Adiciones y monografías nuevas p.p. 1873-1874.
12. FLOREY, Klauss, et. al. Analytical Profiles of Drug Substances. Vol. 17. Edited by Klauss Florey Academic Press Inc. San Diego, California. 1988. p.p. 643-670.

13. GOODMAN Y GILMAN. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 7a. edición. Ed. Médica-Panamericana, México 1981. p.p. 740-742, 780-782.
14. GUERRA, Johnny. Validation of Analytical Methods by FDA Laboratories. Pharmaceutical Technology. p.p. 74-76. March. 1986.
15. KNOLL A.G. Grupo BASF. Antihipertensivos. Clorhidrato de Verapamilo.
16. LACHMAN, Leon. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy. 3rd edition. Lea & Febiger, Philadelphia 1986. p.p. 845.
17. MARTINDALE. The Extra Pharmacopoeia. 29th edition. Edited by James E. F. Reynolds. The Pharmaceutical Press. London, 1989. p.p. 89.
18. THE MERCK INDEX. 10th edition. Published by Merck & Co., Inc. Rahway, N. J., U.S.A. 1983. p.p. 1421.
19. NAVA, Lemus Martín. Q.F.B. Tesis. Validación y Comparación Estadística de 2 Métodos Analíticos para la Determinación de Pirazinamida en tabletas. Fac. Química. UNAM. México, D.F. 1992. p.p. 39.
20. Parámetros Estadísticos y Procedimientos de Validación. Criterios de Aceptación. 2a. parte. Pharma News. p.p. 15-20.
21. RAMETTE, Richard W. Equilibrio y Análisis Químico. Fondo Educativo Interamericano S.A. 1983. p.p. 134-135, 140-141.
22. TOUCHSTONE, Joseph C. et. al. Practice of Thin Layer Chromatography. Chapter 1. Basics of Thin Layer Chromatography. 2nd edition. John Wiley & Sons Inc., 1983. p.p. 1-15.
23. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA XXII - NATIONAL FORMULARY XVII. United States. Pharmacopoeial Convention, Inc., 1989. Official monographs. p.p. 1444.
24. I.Q.I. VAZQUEZ, Luna Isaías. Validación de Procesos. Memorias.
25. WATTY, Margarita. Química Analítica. Depto. de Ing. y Ciencias Químicas. Univ. Iberoamericana. Ed. Alhambra Mexicana. S. A. 1982. p.p. 353-355. 377-381.

26. DE LOS REYES GARCIA ROJAS, Ma. de los Angeles. Q.F.B.
Tesis. Optimización y Validación de Métodos Analíticos
por Cromatografía de Gases y Cromatografía de Líquidos de
Alta Resolución para la Cuantificación de Maleato de
Clorfeniramina, Clorhidrato de Fenilpropanolamina,
Cafeína y Aspirina en Tabletas. UNAM. Fac. Química.
México, D.F. 1992.