



Desarrollo y validación de un método analítico RP-HPLC para la determinación cuantitativa de Dipirona en tabletas

Development and validation of an RP-HPLC analytical method for the quantitative determination of Dipyrone in tablets

LUIS A. TINEO A^{*1}, MARISABEL BOR²

Resumen

La dipirona, también conocida como metamizol, se emplea de manera extensiva para tratar tanto el dolor agudo como el crónico. Es efectiva en situaciones de dolor postoperatorio, migrañas, cólicos renales y dolores oncológicos, además de actuar como antipirético en casos de fiebre persistente. Para su análisis y cuantificación, se utilizan diversas técnicas analíticas como HPLC, yodometría, sistemas FIA con detección amperométrica, espectrofotometría, electroforesis capilar, RMN y voltamperometría. Sin embargo, varios textos farmacopeicos oficiales limitan la cuantificación a la yodometría, lo que restringe la evaluación de impurezas. Por esta razón, se desarrolló y validó un método específico de RP-HPLC que es lineal, exacto y preciso, cumpliendo con los requisitos establecidos por la USP 42 en su apartado <1225>. Las condiciones cromatográficas para la separación y cuantificación del principio activo incluyen el uso de una columna XTerra® RP18 (3,5 µm x 4,6 mm x 100 mm), un flujo de 0,8 mL/min con una fase móvil compuesta por agua, ácido acético glacial y metanol en proporciones (73:1:27) % v/v junto con 140 mg de hexanosulfonato de sodio (pH= 3,20), un volumen de inyección de 20 µL y detección a 260 nm en un detector UV. El método resultó ser selectivo, exacto, preciso, robusto y lineal en un rango de concentración de 0,008 a 0,0120 mg/mL. Este método no solo permite una cuantificación precisa de las tabletas de Dipirona, sino que también facilita la evaluación de impurezas, contribuyendo significativamente a los estudios de estabilidad y al control de calidad en laboratorios analíticos.

Palabras clave: Dipirona, validación, RP-HPLC, cuantificación, tabletas

Abstract

Dipyrone, also known as metamizole, is used extensively to treat both acute and chronic pain. It is effective in postoperative pain, migraines, renal colic, and cancer pain, and antipyretic in cases of persistent fever. Various analytical techniques are used for its analysis and quantification, such as HPLC, iodometry, FIA systems with amperometric detection, spectrophotometry, capillary electrophoresis, NMR, and voltammetry. However, several official pharmacopeial texts limit quantification to iodometry, which restricts the evaluation of impurities. For this reason, a specific RP-HPLC method was developed and validated that is linear, exact and precise, meeting the requirements established by USP 42 in its section <1225>. The chromatographic conditions for the separation and quantification of the active ingredient include the use of an XTerra® RP18 column (3.5 µm x 4.6 mm x 100 mm), a flow of 0.8 mL/min with a mobile phase composed of water, glacial acetic acid and methanol in proportions (73:1:27) % v/v together with 140 mg of sodium hexane sulfonate (pH =3.20), an injection volume of 20 µL and detection at 260 nm in a UV detector. The method was selective, accurate, precise, robust, and linear in a concentration range of 0.008 to 0.0120 mg/mL. This method not only allows accurate quantification of Dipyrone tablets but also facilitates the evaluation of impurities, contributing significantly to stability studies and quality control in analytical laboratories.

Keywords: Dipyrone; validation, RP-HPLC, quantification, tablets

*Laboratorio de Análisis de Medicamentos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Correspondencia: tineo.antequera@gmail.com

Orcid: [0000-0002-3046-9673](https://orcid.org/0000-0002-3046-9673)
[0009-0009-4422-9054](https://orcid.org/0009-0009-4422-9054)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2024.87.3.14](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2024.87.3.14)
Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff
Recepción: 25/11/2024
Aprobación: 04/12/2024

Introducción

El dolor y la fiebre son síntomas comunes que afectan a muchas personas en el mundo. El dolor puede surgir de diversas condiciones médicas, como lesiones o enfermedades crónicas, mientras que la fiebre es un aumento temporal de la temperatura corporal, que constituye una parte de la respuesta general del sistema inmunitario del cuerpo ante infecciones o inflamaciones. Ambos síntomas pueden impactar negativamente la calidad de vida de los pacientes.

La Dipirona es uno de los medicamentos más utilizados para aliviar el dolor y la fiebre, actuando como antipirético y analgésico. Es ampliamente prescrita a nivel mundial para el manejo del dolor agudo, como el postoperatorio o el asociado al cáncer, cólicos y migrañas (Machado-Alba y col., 2019). La dipirona (metamizol) es un analgésico y antipirético del grupo de las pirazolonas; se considera un derivado soluble de la aminopirina. También tiene propiedades antiinflamatorias y espasmolíticas, cuantitativamente de menor magnitud. Igual que otros miembros del grupo, la dipirona inhibe la acción de la ciclooxigenasa y, en consecuencia, la síntesis de prostaglandinas, acción que parece explicar sus propiedades analgésicas y antipiréticas. También la dipirona es capaz de modular los sistemas endógenos opioide y cannabinoide, respectivamente. Ambos sistemas, depresores del sistema nervioso central (SNC), son capaces de producir efectos analgésicos tanto en animales de experimentación como en humanos al interferir con la transmisión de las señales dolorosas (nociceptivas) desde la periferia hasta los centros superiores del SNC (Buitrago-González y col., 2014). Sin embargo, su uso puede

estar relacionado con reacciones adversas graves, como agranulocitosis, lo que ha generado controversias sobre su seguridad. La incidencia de agranulocitosis varía significativamente entre regiones, posiblemente debido a factores como polimorfismos genéticos y condiciones de salud del paciente (Davrieux y col., 2007; Buitrago-González y col., 2014). Esta variabilidad resalta la importancia de un seguimiento médico cuidadoso cuando se prescribe Dipirona.

A pesar de los riesgos asociados, la Dipirona sigue siendo popular en Europa y América Latina. Algunos estudios sugieren una relación entre su uso y la mortalidad, mientras que otros indican que es segura y bien tolerada cuando se utiliza bajo supervisión médica. En países angloamericanos y Escandinavia, la Dipirona no está disponible debido a preocupaciones sobre su seguridad (Buitrago-González y col., 2014; Tomidis y col., 2023). En Venezuela, la Dipirona está disponible en tabletas y soluciones inyectables, ya sea asociada o no con otros principios activos, y se puede obtener con o sin prescripción médica. La importancia de desarrollar métodos analíticos precisos para su determinación radica en la necesidad de garantizar la calidad, seguridad y eficacia del producto final.

Existen varios métodos para la valoración del Metamizol sódico (ingrediente farmacéutico activo, IFA) en la Dipirona, así, se ha reportado un método volumétrico (Iodometría, técnica del fabricante). Este método es el más empleado en la industria farmacéutica, y está descrito en diferentes Farmacopeas (Farmacopea Argentina, 2013, Farmacopea Británica 2020, Real Farmacopea Española, Edición 3, 2005, Farmacopea China,

1990 y Farmacopea Brasileña, 2010). Actualmente, las monografías oficiales solo incluyen métodos yodométricos para la determinación de Dipirona, y en los países donde su uso está restringido no se han establecido métodos analíticos, lo que resalta la necesidad de investigaciones adicionales, especialmente considerando que Venezuela adopta la USP como texto oficial. La falta de métodos estandarizados y validados puede comprometer la calidad de los productos farmacéuticos, lo que resulta en dosis inexactas que podrían ser ineficaces o peligrosas para los pacientes. Por lo tanto, la implementación de métodos analíticos robustos es crucial para garantizar la seguridad de los pacientes. La cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) se presenta como una técnica analítica ideal para este propósito, debido a su alta precisión y sensibilidad. El método analítico propuesto permite una buena separación y ofrece una precisión y exactitud excepcionales en la cuantificación (Quattrocchi, Abelaira, Laba, 1992). El método analítico propuesto no solo busca mejorar los estándares de control de calidad en la industria farmacéutica, sino que también tiene implicaciones significativas para la salud pública al garantizar tratamientos seguros y efectivos. La validación del método incluye la evaluación de parámetros como linealidad, precisión, exactitud, especificidad y robustez, asegurando que el método propuesto cumpla con los estándares internacionales. Es por ello por lo que no solo contribuirá al control de calidad de los medicamentos que contiene Dipirona en los análisis de rutina, sino que también permitirá establecer protocolos de estabilidad y proporcionará una base sólida para futuras investigaciones y aplicaciones en la industria farmacéutica.

Materiales y Métodos

EQUIPOS

Se utilizó un Cromatógrafo líquido de alta eficiencia Waters® compuesto por bomba modelo 600E Millipore, automuestreador plus 717 plus Autosampler acoplado a un detector UV-VIS con arreglo de diodos (PDA) modelo 996 con un Software Millennium® 32 integrado a un computador para la adquisición y procesamiento de datos. En la etapa preliminar se utilizó una Columna C18 Kinetex® (2,6 μm x 4,6 mm x 150 mm), una columna C18 Waters® $\mu\text{Bondapak}$ (10 μm x 3,9 mm x 300 mm), y una columna SGE ProteCol C18 GP 125 (5 μm x 4,6 mm x 250 mm), y para la etapa de desarrollo y validación se utilizó una columna XTerra® RP18 (3,5 μm x 4,6 mm x 100 mm). Todos los reactivos que se utilizaron fueron de grado analítico.

Se utilizó para las pruebas previas de la muestra comercial un estándar de referencia de dipirona 99,8%. Fabricante Sigma-Aldrich. Vigente a la fecha de la investigación.

MUESTRAS

Las muestras analizadas pertenecen a dos productos comerciales en forma de tabletas, ambos con un contenido declarado de 500 mg de Dipirona. Para la fecha del estudio, ambos productos estaban disponibles en el mercado y se podían adquirir en Venezuela. El medicamento A (material de referencia interno; MRI) es fabricado por un laboratorio nacional, mientras que el medicamento B es un producto importado, distribuido por una casa de representación.

PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR DE REFERENCIA

Se preparó una solución estándar con una concentración de 0,01 mg/mL utilizando una solución diluyente compuesta por agua, ácido acético y metanol en una proporción de 79:1:20 % v/v. Esta mezcla se empleó como solvente. Para las diluciones posteriores, se utilizó la fase móvil.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se pesó aproximadamente $\frac{1}{4}$ del peso promedio del polvo de tabletas con una precisión de $\pm 0,01$ mg, y se transfirió a un balón aforado de 50 mL, al que se le añadieron 25 mL de una solución diluyente compuesta por agua, ácido acético y metanol en una proporción de 79:1:20 % v/v. La mezcla se agitó en un vórtex durante un minuto y luego se sometió a ultrasonido durante 5 minutos. Posteriormente, se enrasó con la misma solución diluyente hasta alcanzar la línea de aforo. Una cantidad adecuada de esta mezcla se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó durante 5 minutos. A continuación, se tomó una alícuota de 4 mL que se transfirió a un balón aforado de 100 mL, llevándola a volumen con la fase móvil hasta la línea de aforo. Finalmente, se realizó una dilución de 1,00 mL en 10,00 mL utilizando la misma fase móvil, y antes de inyectar la disolución en el cromatógrafo, se filtró con un disco de nylon (PVDF) de 0,45 μm .

DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

En la fase preliminar, se utilizaron equipos e insumos disponibles para la determinación de dipirona mediante la técnica de RP-HPLC. Tras establecer las

condiciones del sistema cromatográfico, se llevó a cabo la evaluación de los parámetros cromatográficos y la validación del método, antes de proceder al análisis de un producto comercial.

Para determinar la longitud de onda óptima, se empleó un detector de arreglo de diodos y se realizó un barrido de longitudes de onda en el rango de 200 a 400 nm. En este procedimiento, se utilizó una solución patrón de 0,10 mg/mL en una mezcla de acetonitrilo y agua en proporción 50:50 % v/v. El máximo de absorción se registró a una longitud de onda de 260 nm, lo que se consideró adecuado para el estudio. El espectro de absorción UV correspondiente se presenta en la Figura 1.

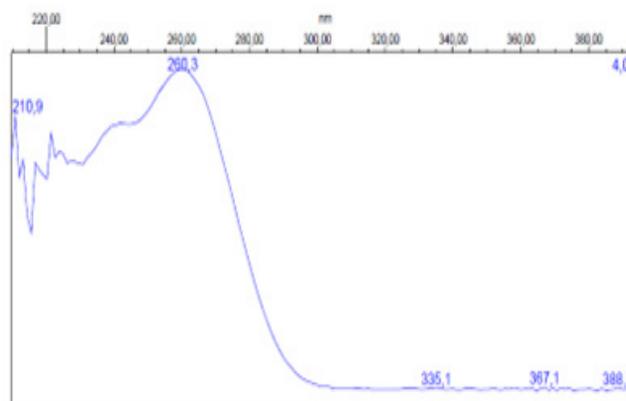


Figura 1. Espectro de absorción UV de Dipirona

La selección de la fase móvil se realizó mediante ensayos que incorporaron diversas combinaciones propuestas en investigaciones previas. Asimismo, se llevaron a cabo preparaciones de múltiples fases móviles hasta identificar la más idónea. Para este propósito, se utilizó una elución isocrática a temperatura ambiente y a una longitud de onda de 260 nm. En la determinación de las fases móviles adecuadas para llevar a cabo las evaluaciones preliminares, se tuvo en cuenta la propiedad ácido-base del

compuesto, dado que la Dipirona presenta un pKa de 4,8. Este dato sugiere que una variación en el pH de la fase móvil podría optimizar la separación. La fase móvil que exhibió los resultados más favorables consiste en un equilibrio de (73:1:27) % v/v entre agua, ácido acético glacial y metanol, complementada con 140 mg de hexanosulfonato de sodio ajustado a un pH de 3,20. El cromatograma obtenido se ilustra en la Figura 2.

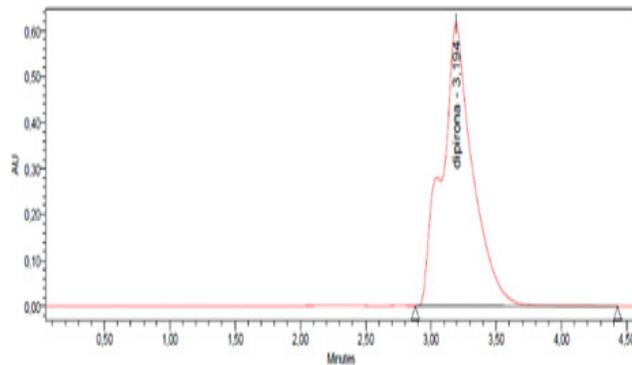


Figura 2. Cromatograma Dipirona agua: ácido acético glacial: metanol, en proporciones (73:1:27) % v/v con 140 mg de hexanosulfonato de sodio pH 3,20 empleando columna XTerra® RP18

La identificación de picos superponibles en el cromatograma sugiere la imperiosa necesidad de optimizar el tratamiento del patrón analítico. La solución diluyente, compuesta por agua, ácido acético glacial y metanol en una proporción específica de 79:1:20, permite la obtención de un pico bien definido, libre de interferencias. Este resultado contrasta notablemente con otros escenarios en los que se presentan señales interferentes y picos no resueltos. Se implementó un protocolo de tratamiento para las muestras de tabletas de Dipirona, logrando una respuesta analítica comparable a la del patrón, como se evidencia en la Figura 3.

La USP establece que los valores de K' para una separación cromatográfica óptima

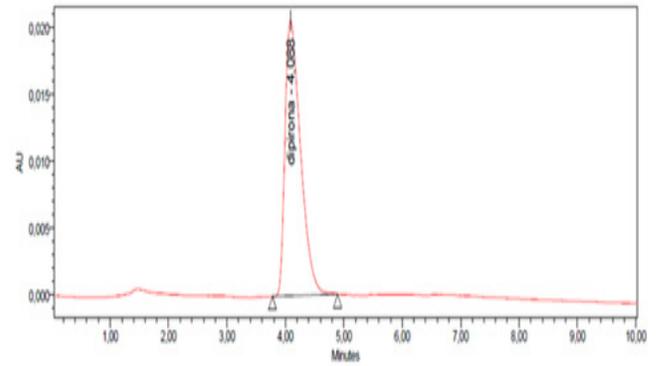


Figura 3. Cromatograma muestra de tableta de dipirona. agua: ácido acético glacial: metanol 79:1:20 como solución diluyente

deben situarse entre 1 y 10. En el análisis de la separación de la Dipirona, se determinó un valor de $K' = 1.300$ en relación con el tiempo muerto correspondiente a la acetona ($T_m = 1,8$ min), lo cual se considera aceptable dentro de los estándares establecidos. Por consiguiente, se concluye que tanto la fase móvil como la solución diluyente empleadas son adecuadas para llevar a cabo la separación de este compuesto.

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Las condiciones cromatográficas establecidas fueron las siguientes: la fase móvil consistió en una mezcla de agua, ácido acético glacial y metanol, en proporciones volumétricas de 73:1:27 % v/v, complementada con 140 mg de hexanosulfonato de sodio ($\text{pH} = 3,2 \pm 0,1$). Se utilizó un volumen de inyección de 20,0 μL y una velocidad de flujo de 0,8 mL/min, manteniendo la temperatura ambiente. La columna empleada fue una XTerra® RP18 (3,5 μm x 4,6 mm x 100 mm), y una longitud de onda de 260 nm.

VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

Una vez desarrollada la metodología analítica, se procedió a su validación

conforme a la categoría I del apartado <1225> de la USP 42, destinada a la cuantificación de principios activos en productos farmacéuticos terminados.

Para evaluar la idoneidad del sistema cromatográfico, se inyectaron cinco réplicas de un patrón que contenía 0,01 mg/mL, bajo las condiciones cromatográficas previamente establecidas. Este procedimiento se llevó a cabo antes de cada estudio relacionado con los parámetros de validación.

Se considera que el sistema cromatográfico es apto para su uso cuando los resultados obtenidos para los parámetros de tiempo de retención y área de los picos presentan una dispersión mínima en el conjunto de datos, lo que se traduce en coeficientes de variación inferiores al 2%.

Estos valores se encuentran dentro de los límites estipulados para métodos cromatográficos, según lo establecido por la USP, que define un límite del 2% como criterio para la precisión de los métodos analíticos.

LINEALIDAD

Se estableció un valor de concentración de referencia para el patrón de Dipirona, siendo 0,01 mg/mL la concentración que corresponde al 100%. A partir de este valor, se elaboraron patrones que abarcaron un rango del 80 al 120%.

En diferentes días, se realizaron tres curvas de calibración. Cada una de ellas consistió en cinco concentraciones distintas de patrones, que se situaron aproximadamente entre 0,008 y 0,012 mg/mL de Dipirona. Luego, se inyectó cada patrón en el cromatógrafo y se

construyeron las curvas de calibración, representando gráficamente el área de la señal cromatográfica en función de la concentración del analito de interés. A continuación, se determinó tanto el coeficiente de correlación (R) como el coeficiente de determinación (R^2)

La linealidad se verificó a través de los coeficientes de variación de los factores de respuesta (f). De acuerdo con la Asociación Española de Farmacéuticos en la Industria (AEFI), el factor de respuesta (f) ilustra la relación entre la lectura o respuesta (área) y la concentración, lo que puede verse como una medida de la sensibilidad del calibrado. En una calibración lineal, los factores de respuesta deben ser similares entre sí y estar cercanos al valor de la pendiente. Coeficientes de variación (CV) mayores al 5% podrían señalar una posible falta de linealidad, por lo que se aconseja que no excedan el 2%. Estos datos también son sustentados al realizar el análisis de residuales.

PRECISIÓN

Se evaluó la precisión del método mediante la determinación de la exactitud del sistema cromatográfico, abarcando tanto la repetibilidad como la precisión intermedia. Para llevar a cabo esta evaluación, se analizaron un conjunto considerable de muestras, lo que facilitó el cálculo estadístico de la desviación estándar y el coeficiente de variación (desviación estándar relativa).

PRECISIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Se llevó a cabo una evaluación de la precisión del sistema cromatográfico

mediante la inyección repetida de una solución patrón que contenía 0,010 mg/mL de Dipirona en cinco ocasiones. Posteriormente, se calculó el coeficiente de variación correspondiente, tanto para las áreas como para los tiempos de retención.

REPETIBILIDAD

Se llevó a cabo mediante la preparación de seis muestras del MRI al 100 % (0,010 mg/mL de Dipirona), siguiendo las especificaciones establecidas para la preparación de la muestra. Cada muestra fue inyectada por duplicado en el cromatógrafo. A partir de las áreas obtenidas de estas muestras y de una curva de calibración elaborada ese mismo día, se determinó el valor promedio y el coeficiente de variación de la cantidad de Dipirona (mg/tab), así como el porcentaje en relación con lo declarado.

PRECISIÓN INTERMEDIA

En este estudio, se realizó un análisis específico de la precisión intermedia en diferentes días, empleando un mismo equipo. Para ello, se prepararon tres muestras al 100% del MRI (0,010 mg/mL de Dipirona), siguiendo las especificaciones. Cada muestra fue inyectada por duplicado en el cromatógrafo. A partir de las áreas obtenidas de estas muestras y de una curva de calibración elaborada para cada día, se calcularon el valor promedio y el coeficiente de variación de la cantidad de Dipirona en mg/tab.

ESPECIFICIDAD

Dado que no se contaba con sustancias relacionadas ni impurezas, la especificidad

se evaluó a través de un ensayo de degradación forzada. Este procedimiento se realizó utilizando indicadores de estabilidad, exponiendo las muestras a condiciones de estrés antes de su inyección en el sistema cromatográfico. Posteriormente, se analizó la pureza de los picos cromatográficos mediante la comparación de los valores del ángulo de pureza (PA) y el umbral de ruido (TH). Esta evaluación es fundamental para identificar la presencia de impurezas y productos de degradación, tanto en la materia prima como en los excipientes; si el valor de PA supera al de TH, se infiere que puede haber coelución de alguna impureza con el analito. El ensayo consistió en pesar aproximadamente $\frac{1}{4}$ del peso promedio del MRI en un matraz de 50,00 mL, sometiendo cada muestra a las siguientes condiciones de degradación forzada:

Fotólisis: Exposición a radiación UV a 254 nm durante 7 días.

Hidrólisis Ácida: Se añadieron 15,00 mL de ácido clorhídrico (HCl) 1N y se mantuvo en reposo durante 7 días, protegido de la luz.

Hidrólisis Básica: Se incorporaron 15,00 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 1N y se dejó reposar por 7 días, resguardado de la luz.

Oxidación: Se añadieron 15,00 mL de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 10 % y se dejó reposar durante 7 días, protegido de la luz.

Termólisis: La muestra fue calentada en un baño de vapor a una temperatura constante de 60 °C durante 1 hora.

Para el ensayo de termólisis se empleó un balón aforado de vidrio Jenna de 50,00 mL capaz de soportar los cambios

de temperatura. Una vez finalizado el tiempo de exposición, se continuó con el procedimiento indicado para la preparación del material de referencia. Además, se preparó un patrón al 100% con una concentración de 0,01 mg/mL de Dipirona. La muestra control, que fue preparada y analizada, se dejó reposar durante 1 día protegida de la luz para su posterior reanálisis, con el objetivo de evaluar la degradación del análisis del medicamento a lo largo del tiempo. Este análisis se complementó con el estudio de pureza del pico cromatográfico correspondiente a cada ensayo.

EXACTITUD

La exactitud se determinó utilizando el método de agregado de estándar, que consiste en añadir una cantidad conocida de un patrón con una concentración establecida a las muestras, abarcando diferentes niveles de concentración. Para ello, se incorporó una cantidad específica de un patrón de concentración conocida al material de referencia y se calculó el porcentaje de recuperación. Para llevar a cabo esta evaluación, se prepararon soluciones de muestras fortificadas (spike) en tres niveles de concentración distintos: 75%, 100% y 125% de la concentración normal de trabajo. Cada nivel se analizó mediante muestras independientes preparadas por triplicado. Finalmente, se calculó el porcentaje de recuperación se utilizó como indicador de la exactitud de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\% \text{Recuperación} = \frac{\text{Conc. Muestra+Spike} - \text{Conc. Muestra}}{\text{Concentración Patrón}} \times 100$$

Las concentraciones de las muestras se calcularon utilizando una curva de

calibración elaborada el mismo día del análisis.

Robustez

La evaluación de la robustez del método se realizó mediante una serie de parámetros que permiten medir la idoneidad del sistema. Esto garantiza que el procedimiento analítico utilizado mantenga su validez. Los parámetros definidos para esta evaluación incluyen el flujo de la fase móvil, el pH de la fase móvil y la composición del disolvente orgánico, específicamente el porcentaje de metanol. La utilización del diseño de la matriz de Plackett y Burman facilitó un análisis exhaustivo del impacto que tienen las variables seleccionadas al ser modificadas ligeramente. Posteriormente, se verifica si alguna de las variables influye significativamente en el resultado. Esta comprobación se realiza evaluando la diferencia obtenida por el cambio en el parámetro con el producto de S y la raíz cuadrada de 2, según se indica en la siguiente expresión:

$$\text{Si } |V_B| > s\sqrt{2} \Rightarrow \text{Diferencia significativa}$$

Donde V_B representa el módulo de la diferencia y s es la desviación estándar.

LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Las pruebas de límite tienen como objetivo verificar si la concentración del analito se encuentra por encima o por debajo de un umbral específico. Se llevó a cabo una curva de calibración en un rango de concentración de 0,479 a 1,100 ppm. El límite de detección se establece mediante una estimación estadística expresada como:

$$\text{LOD} = \frac{3,3 S_{y/x}}{S}$$

Por otro lado, el límite de cuantificación se determina también a través de una estimación estadística expresada de la siguiente manera:

$$\text{LOQ} = \frac{10 S_{y/x}}{S}$$

En esta última, $S_{y/x}$ representa la desviación estándar de la respuesta y S es la pendiente de la curva de calibración. Este análisis resulta ser un aporte significativo para el método de cuantificación de Dipirona, ya que brinda información sobre la sensibilidad del procedimiento y puede ser utilizado como un método potencial para detectar trazas de este principio activo.

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE DIPIRONA EN UN MEDICAMENTO

Una vez que se desarrolló y validó el método analítico por HPLC, se procedió a cuantificar la cantidad de Dipirona en un medicamento que estaba vigente al momento del análisis.

Para ello, se pesaron y pulverizaron al menos 10 tabletas, obteniendo aproximadamente $\frac{1}{4}$ del peso promedio total. Posteriormente, se realizó el tratamiento de las muestras siguiendo la metodología propuesta. Se prepararon tres muestras que fueron inyectadas por duplicado.

Resultados

VALIDACIÓN DEL MÉTODO

En la Figura 3 se muestra el cromatograma de la muestra, la cual fue preparada a una

concentración de 0,010 mg/mL. Se puede apreciar que no hay interferencias entre los excipientes y el principio activo presentes en la muestra. Además, los tiempos de retención de las corridas cromatográficas son menores a 5 minutos y durante la adecuación del sistema cromatográfico los valores del coeficiente de variación son incluso menores al 2% con lo cual, el sistema se encuentra debidamente apto para ser utilizado.

LINEALIDAD

Al calcular los coeficientes de correlación (R) y determinación (R^2) a partir de las tres curvas de calibración elaboradas, se evidencia una relación lineal adecuada entre las áreas y la concentración en los distintos días de estudio. Los valores de R obtenidos son iguales o superiores a 0,999. Se puede verificar la pendiente de una curva de calibración mediante la determinación del coeficiente de variación de los factores de respuesta. El factor de respuesta (f) se define como la relación entre la lectura o respuesta y la concentración, y puede considerarse como una aproximación de la sensibilidad de calibración (área del patrón / concentración del analito). El porcentaje del coeficiente de variación de los factores de respuesta (%CVf) no debe exceder el 5%. Estos coeficientes fueron calculados para cada una de las curvas de calibración que se presentan en la Figura 4. Se obtuvo un porcentaje de variación en los factores de respuesta (CVf) inferior al 5% en todas las curvas de calibración, lo que indica una correlación lineal significativa entre las áreas obtenidas y la concentración del analito. Este resultado cumple con el criterio de aceptación para el análisis, lo que demuestra que los resultados son confiables.

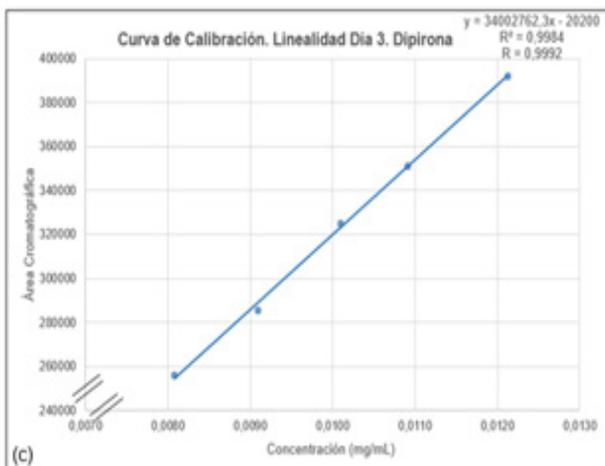
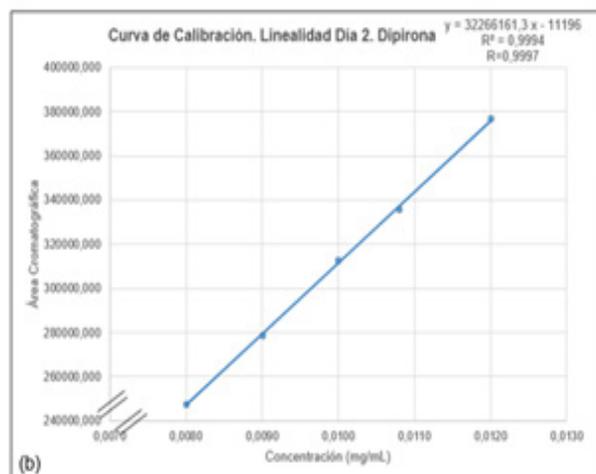
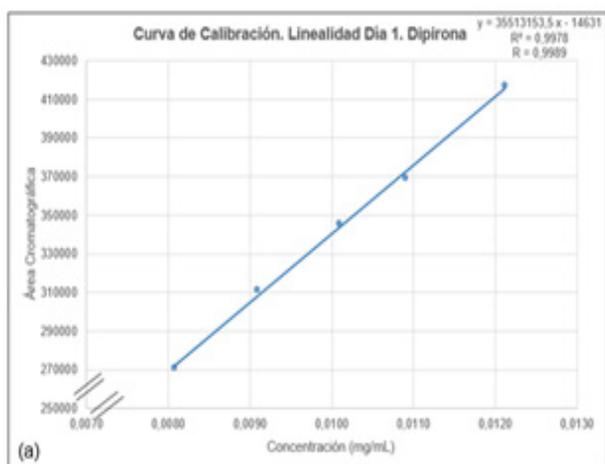


Figura 4. (a) Curva de Calibración Dipirona Día 1 (b) Curva de Calibración Dipirona Día 2 (c) Curva de Calibración Dipirona Día 3

Además, se llevó a cabo un análisis de residuos para identificar cualquier anomalía en la regresión, confirmando que el modelo de calibración utilizado es

adecuado, dado que los errores residuales se distribuyen aleatoriamente. Esto sugiere que el ajuste lineal por mínimos cuadrados para los diferentes días es aceptable y presenta una distribución satisfactoria. En consecuencia, se concluye que la linealidad no fue afectada por la variabilidad en las condiciones operativas y ambientales durante los distintos días de estudio. En la Tabla I se presentan los criterios de aceptación para la linealidad del Dipirona.

Precisión

PRECISIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Se llevó a cabo una evaluación de la precisión del sistema cromatográfico mediante la inyección repetida de una solución patrón que contenía 0,010 mg/mL de Dipirona, realizándose cinco inyecciones. Los resultados revelaron un tiempo de retención (TR) promedio de 4,434 minutos y un coeficiente de variación (CV) de 0,123%. Asimismo, el promedio de las áreas obtenidas fue de 4171,69, con un CV de 1,44%. Los coeficientes de variación tanto para el tiempo de retención como para las áreas del patrón se situaron significativamente por debajo del 2%, lo que indica una conformidad excelente. Esto sugiere que el sistema cromatográfico estaba correctamente configurado y es apto para su uso.

REPETIBILIDAD

La repetibilidad se evaluó mediante la preparación de seis muestras al 100% (0,010 mg/mL), siguiendo las especificaciones del material de referencia previamente descrito. Cada muestra se inyectó por duplicado en el cromatógrafo. A partir de

Tabla I.
Criterios de aceptación para la linealidad de Dipirona

Parámetros de Linealidad	Curva de Calibración		
	Día 1	Día 2	Día 3
Ecuación de la recta	$y = 35513153,5x - 14631$	$y = 32266161,3x - 11196$	$y = 34002762,3x - 20200$
Coefficiente de Correlación (R)	0,9989	0,9997	0,9992
%CV _f	1,05	0,67	1,21

las áreas obtenidas y utilizando una curva de calibración preparada el mismo día, se determinó el valor promedio, el coeficiente de variación de la cantidad de Dipirona (mg/tab) y el porcentaje en relación con lo declarado (Tabla II). La evaluación de la precisión del método a través de la repetibilidad mostró un coeficiente de variación inferior al 2%, lo que indica que la precisión evaluada se encuentra dentro de los límites establecidos para métodos cromatográficos.

PRECISIÓN INTERMEDIA

Aunque se observaron variaciones en los valores de concentración por tableta en cada día, las concentraciones porcentuales se acercaron significativamente a la cantidad declarada (500 mg de Dipirona), con valores de 107,23 %, 107,46 % y 104,42 % para los días 1, 2 y 3, respectivamente (Tabla III).

Estos porcentajes se encuentran dentro del rango aceptable del 90-110%, lo que indica que el método utilizado es adecuado.

Tabla II.
Precisión del Método para la Determinación de Dipirona

Réplicas	Masa de Muestra (g ± 0,001)	Cantidad de Dipirona (mg/tab)	Promedio Cantidad de Dipirona (mg/tab)	Porcentaje Respecto a lo Declarado	%CV
1	156,99	516,5	517,0	103,4	0,1
		517,5			
2	157,04	522,4	524,1	104,8	0,5
		525,7			
3	157,30	532,9	533,2	106,6	0,1
		533,6			
4	157,75	535,5	537,8	107,6	0,6
		540,1			
5	157,56	536,7	536,4	107,3	0,1
		536,0			
6	157,50	532,9	534,3	106,9	0,4
		535,7			
		Promedio	530,5	106,1	
		DE	8,2	1,6	
		%CV	1,5	1,5	

CV= Coeficiente de variación | Tab = tableta

Tabla III.
Precisión Intermedia del método para la determinación de Dipirona

		Dipirona mg/tab	Dipirona mg/tab	Dipirona mg/tab
Réplica de Muestra	Réplica	Día 1	Día 2	Día 3
1	1	535,5	538,5	536,8
	2	540,1	534,4	533,2
2	1	536,7	533,6	514,7
	2	536,0	528,7	515,6
3	1	532,9	548,5	517,2
	2	535,7	543,9	515,1
Promedio		536,2	537,9	522,1
DE		2,3	7,3	10,1
%CV		0,4	1,4	1,9

CV= Coeficiente de variación | Tab = tableta

Además, los coeficientes de variación son inferiores al 2%, sugiriendo que la precisión evaluada a través de la precisión intermedia está dentro de los límites establecidos para métodos cromatográficos.

La precisión intermedia se evaluó utilizando dos enfoques: primero, mediante límites de confianza que indican que el contenido del principio activo está dentro de una probabilidad del 95%, utilizando un valor $t = 4,303$ para 2 grados de libertad a una significancia del 95%. En segundo lugar, se aplicó la ecuación de Horwitz y Albert (2006) para determinar el coeficiente de variación propuesto por estos autores y compararlo con el coeficiente obtenido en el análisis.

El valor promedio fue de 532,08 mg/tab con un coeficiente de variación del 1,63%. Se calculó el coeficiente de variación (CVH) propuesto por Horwitz y Albert utilizando la siguiente expresión:

$$CV_H = 2_{(1-0.5) \log C}$$

Donde C es la fracción del analito en la muestra ($C = \text{g analito/g muestra}$). Se obtuvo

un $CV_H = 0,97$. El coeficiente de variación obtenido se comparó utilizando el parámetro HoRat. El índice de Horwitz (HorRat) es un parámetro de rendimiento normalizado que indica la aceptabilidad de los métodos de análisis con respecto a la precisión entre laboratorios (reproducibilidad), donde $HoRat = CV / CV_H$.

Para Dipirona se obtuvo un $HoRat = 1,68$. Por lo tanto, el método presenta valores aceptables de precisión intermedia, ya que el valor obtenido para el parámetro HoRat es igual o menor a 2, demostrando así que el método es preciso.

ESPECIFICIDAD

Las muestras sometidas a condiciones de degradación forzada fueron analizadas y los resultados se compararon con un patrón y una muestra de control. Con el patrón de 0,01 mg/mL de Dipirona, se observó que el pico correspondiente a la Dipirona eluye a 4,094 minutos.

El cromatograma no presenta especies interferentes, y el ángulo de pureza (PA) es inferior al ángulo del umbral (TH), lo que indica la ausencia de coelución entre el analito de interés y posibles impurezas. En el gráfico de pureza del primer paso (Figuras 5 y 6), el valor de PA es 0,351, menor que TH que es 0,430, lo que confirma que el método puede separar completamente el analito de otras sustancias presentes en la muestra.

Las muestras fueron condiciones de degradación forzada mediante; Fotólisis con exposición a radiación UV a 254 nm durante 7 días; Hidrólisis Ácida con ácido clorhídrico 1N y durante 7 días, protegido de la luz; Hidrólisis Básica con hidróxido

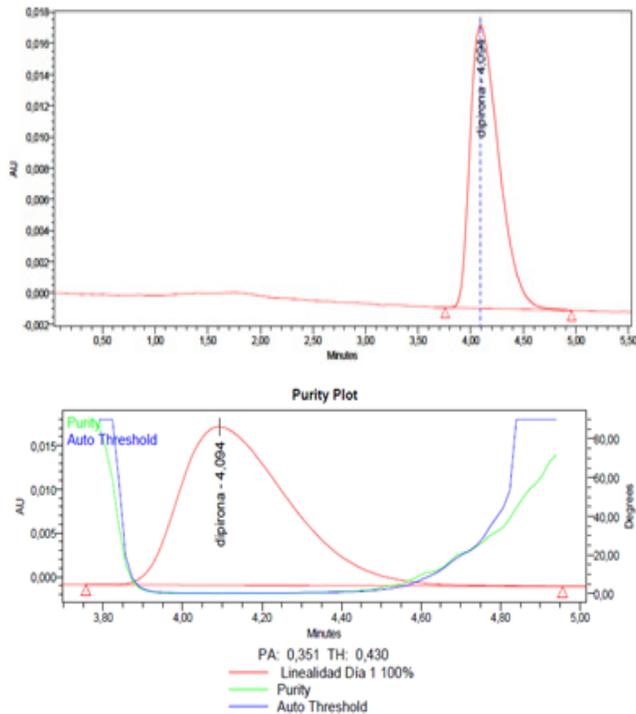


Figura 5. Cromatograma y Gráfico de Pureza de Patrón Control

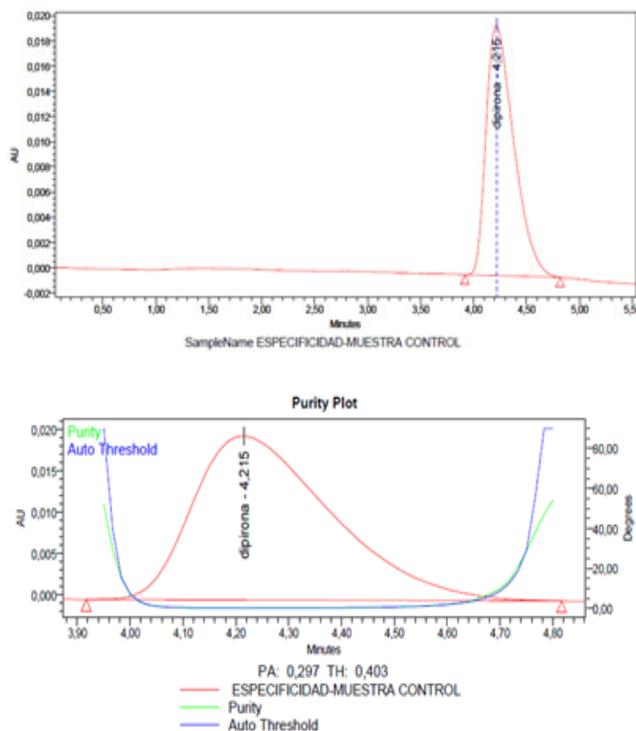


Figura 6. Cromatograma y Gráfico de Pureza de Muestra Control

de sodio por 7 días, resguardado de la luz; Oxidación con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 10 % durante 7 días, protegido de la luz; y Termólisis: La muestra fue calentada en un baño de vapor a una temperatura constante de 60 °C durante 1 hora (Figuras 7 al 11). Exceptuando la muestra reanalizada 24 horas después y la degradación forzada por oxidación, el PA en los demás ensayos es menor que TH, lo que sugiere una pureza adecuada. Los resultados obtenidos tras las pruebas de degradación forzada se presentan en la Tabla IV.

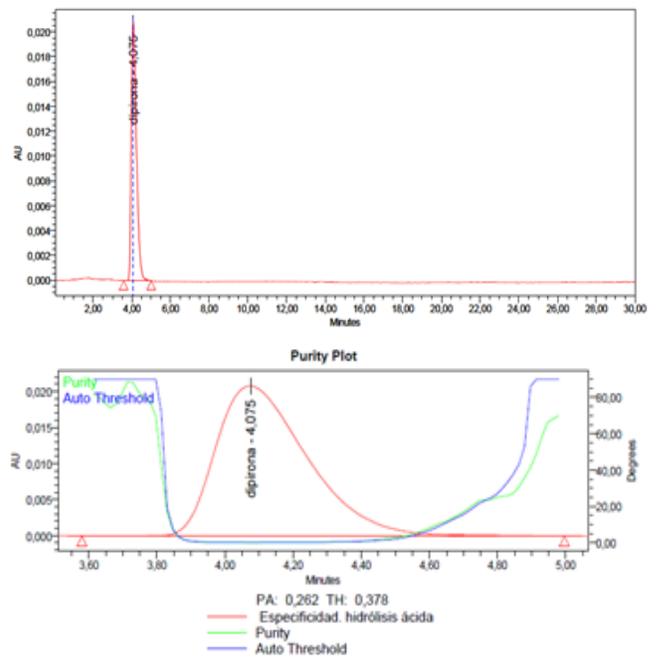


Figura 7. Cromatograma y gráfico de pureza de muestra sometida a hidrólisis ácida por 7 días

En el caso de la degradación forzada por oxidación, se observó una degradación total del analito; la muestra adquirió una coloración verde-amarilla que se mantuvo solo hasta la primera dilución. No se detectó señal alguna de Dipirona, y apareció una nueva señal cromatográfica que eluye a 1,8 minutos. Al comparar esta señal con su espectro de absorción, se encontró un máximo a 229,7 nm, que no corresponde a la Dipirona. Además, el PA fue 0,759,

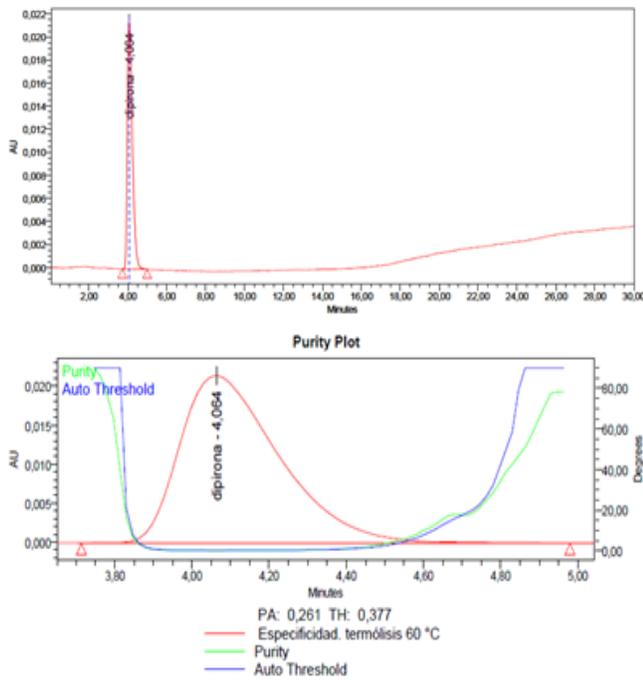


Figura 8. Cromatograma y gráfico de pureza de muestra sometida a termólisis 60°C por una hora

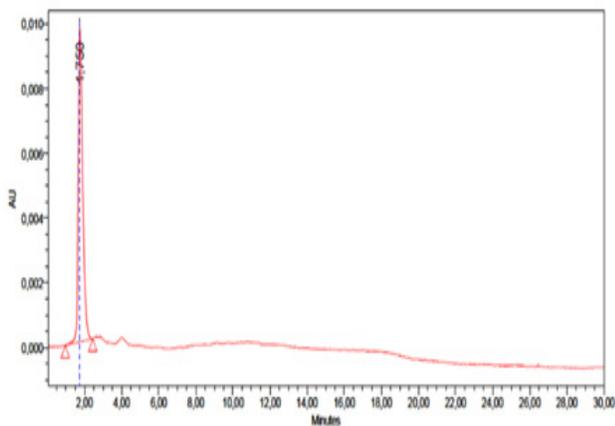


Figura 9. Cromatograma y gráfico de pureza de muestra sometida a estrés oxidativo por 7 días

significativamente mayor que TH (0,454). Esto permite concluir que la Dipirona sufre un proceso de oxidación al añadir peróxido de hidrógeno.

La especificidad del método cromatográfico también fue evaluada bajo las siguientes condiciones: Hidrólisis básica: Se expuso una muestra a 15,00 mL de solución de hidróxido de sodio 3N durante 7 días en condiciones protegidas de luz (Figura 12). Radiación UV: Se expuso una muestra en solución diluyente a radiación UV a 254 nm durante 7 días (Figura 13).

Al finalizar la exposición a hidrólisis básica, se observó una coloración roja intensa que cambió a verde-amarillo tras agregar solución diluyente. El pico correspondiente a la Dipirona eluyó a 4,2 minutos sin evidencias de especies interferentes. Esto se corroboró con un PA menor que TH: PA = 0,311 y TH = 0,414.

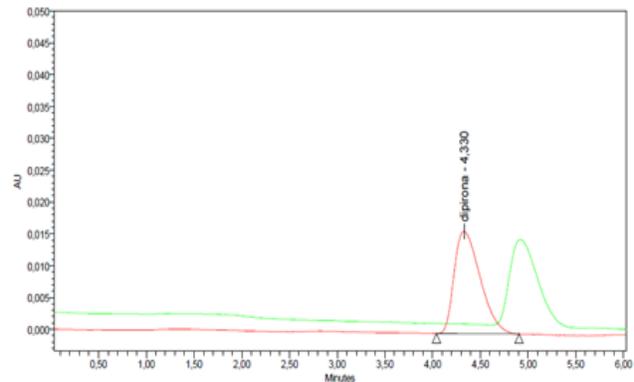


Figura 10. Superposición de cromatogramas muestra control y muestra control a las 24 horas

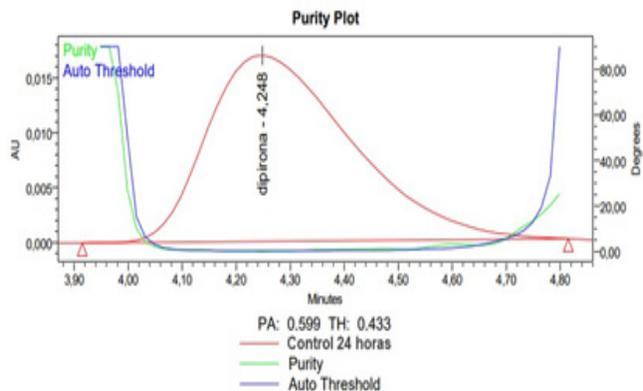
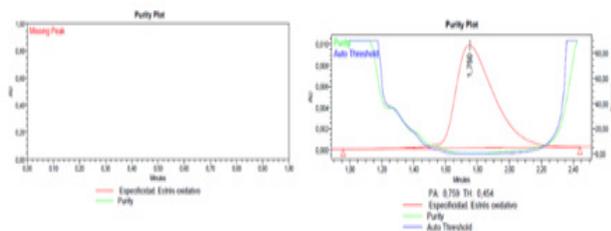


Figura 11. Gráfico de pureza de muestra control 24 horas después de haber sido preparada

Tabla IV.
Especificidad del método para la determinación Dipirona

Condición	PA	TH	Cantidad de Dipirona (mg/tab)	Porcentaje Respecto al Declarado (%)	Porcentaje de Degradación (%)
Muestra Control	0,297	0,403	535,2	107,1	-----
Muestra Control (reanalizada 24 horas)	0,599	0,433	486,7	97,3	9,7
Fotólisis	0,388	0,403	516,0	103,2	3,8
Hidrólisis ácida	0,262	0,378	517,2	103,4	3,6
Hidrólisis básica	0,336	0,449.	508,9	101,8	5,3
Oxidación	-----	-----	-----	-----	-----
Termólisis	0,261	0,377	514,2	102,9	4,2
Hidrólisis básica	0,311	0,414	480,7	96,1	11,4
Fotólisis (Muestra en Solución)	0,646	0,610	238,1	47,6	59,4

PA= Ángulo de pureza | TH= Ángulo del umbral | % respecto a lo declarado= 500mg/tab

En cuanto a la fotólisis tras 7 días de exposición a radiación UV, el pico de Dipirona también eluyó a 4,2 minutos. Sin embargo, se detectó una señal adyacente al pico principal que eluyó a 5,4 minutos. Comparado con la fotólisis en ausencia de solución diluyente, se observó una disminución en la altura del pico cromatográfico de Dipirona. La especie interferente fue confirmada por un PA mayor que TH: PA = 0,646 y TH = 0,610.

EXACTITUD

Los porcentajes de recuperación de Dipirona se presentan en la Tabla V. Los resultados, expresados como porcentaje de recuperación, se encuentran dentro de los límites aceptables establecidos, que van del 98,0 % al 102,0 % en promedio para cada nivel, conforme a lo indicado por la ICH, con un coeficiente de variación inferior al 2,0%.

Al evaluar la linealidad entre las concentraciones estimadas y reales de

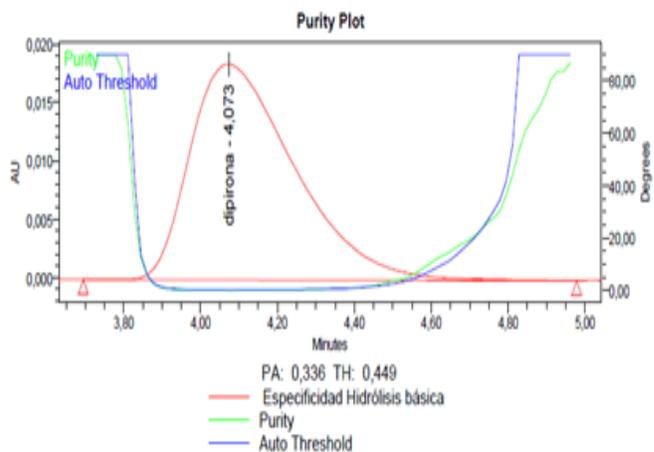
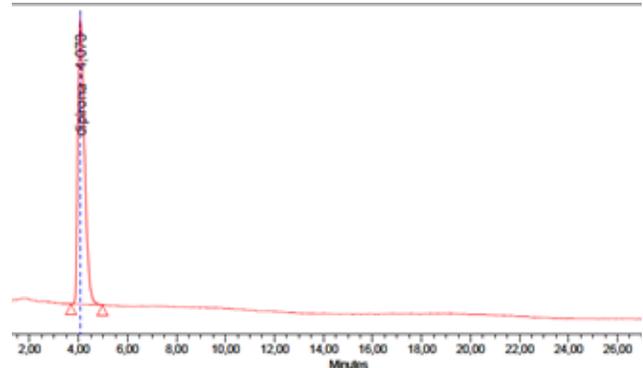


Figura 12. Gráfico de pureza de muestra control 24 horas después de haber sido preparada

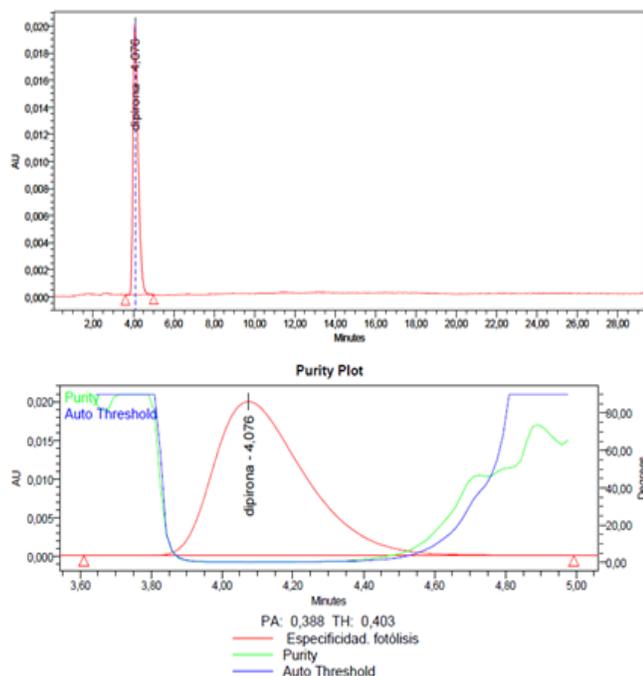


Figura 13. Cromatograma y gráfico de pureza de muestra sometida a fotólisis por 7 días

Dipirona a través de su representación gráfica, se observa que los coeficientes de determinación son notablemente cercanos a uno, con valores superiores a 0,999. Esto indica una relación estrecha entre las concentraciones estimadas y las reales, sugiriendo que los valores estimados son muy similares a los reales. La Figura 14 ilustra la relación entre las concentraciones estimadas y reales (75, 100 y 125%) de Dipirona.

ROBUSTEZ

En la Tabla VI se presenta la interpretación de los resultados relacionados con la robustez, utilizando el modelo de Plackett-Burman. Un diseño de Plackett-Burman (un tipo de diseño de selección) ayuda a descubrir qué factores son importantes en un experimento. Este diseño descarta factores sin importancia (ruido), lo que significa que evita recopilar grandes cantidades de datos sobre factores relativamente poco importantes. Las variables analizadas muestran valores inferiores a $S\sqrt{2}$ (8,72), lo que permite concluir que el método es robusto bajo las tres condiciones evaluadas: pH de la fase móvil, composición de metanol y flujo. Estos hallazgos aseguran que el método analítico puede resistir diversas alteraciones experimentales sin comprometer la determinación del contenido de Dipirona.

LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

La desviación estándar de la respuesta (Sy/x) es de 6070 y la pendiente de la curva de calibración es 26624352. Esto resulta en un límite de detección de 0,75 pp y un límite de cuantificación de 2,28 ppm (Figura 15).

Tabla V.

Exactitud expresada como porcentaje de recuperación de Dipirona

%Recuperación	Promedio	%CV	%Encontrado	Nivel de Concentración
100,23	101,02	2,61	75,77	75
103,96				
98,87				
101,08	99,67	1,43	99,67	100
99,71				
98,22				
101,80	100,85	1,10	126,06	125
99,62				
101,12				

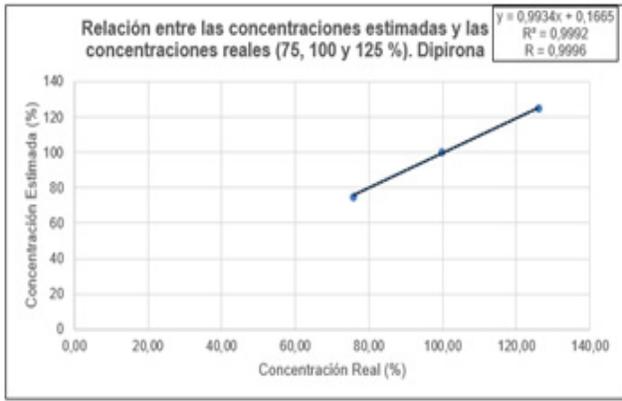


Figura 14. Relación concentraciones estimadas reales (75, 100 y 125%) Dipirona

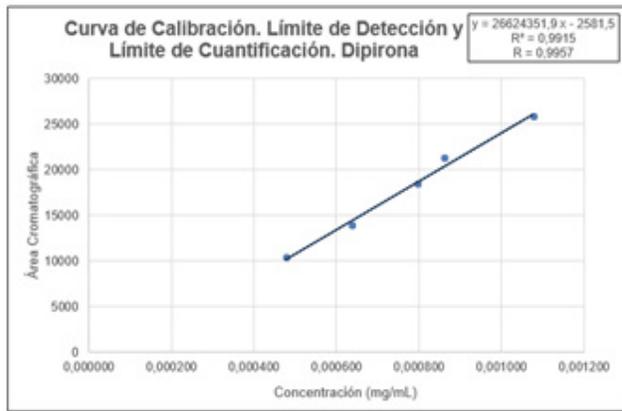


Figura 15. Curva de Calibración LOD y LOQ Dipirona

Tabla VI.

Interpretación de los resultados de la robustez del método según el modelo de Plackett-Burman

Condición	Influencia	Resultado
A	-2,62	Conforme
B	3,54	Conforme
C	2,54	Conforme
AB	-1,74	Conforme
AC	-0,45	Conforme
BC	2,58	Conforme
ABC	-0,23	Conforme

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE DIPIRONA EN UN MEDICAMENTO

En la Tabla VII se muestra los resultados del análisis de un medicamento vigente

en el momento del estudio. Se estableció un criterio de aceptación que requiere que el contenido se encuentre entre el 90% y el 110% respecto a la cantidad declarada por el fabricante. Este cálculo se realiza comparando la cantidad del analito encontrada con la cantidad indicada por el fabricante, expresada como un porcentaje. Todos los resultados se sitúan dentro del rango aceptable. Además, este criterio también cumple con un coeficiente de variación inferior al 2%, lo que indica una alta precisión y confiabilidad en los resultados obtenidos.

Discusión

Se desarrolló y validó un método analítico basado en cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para la cuantificación de dipirona en tabletas. Los parámetros de validación evaluados fueron: Especificidad, Linealidad, Exactitud y la Precisión (Repetibilidad y Precisión intermedia). Los resultados del estudio sobre la linealidad de las curvas de calibración para la Dipirona mostraron coeficientes de correlación (R) superiores a 0,999, indicando una relación lineal ideal entre las áreas medidas y las concentraciones del analito. El coeficiente de variación de los factores de respuesta (%CVf) fue inferior al 5%, lo que respalda la fiabilidad de los datos. El análisis de residuales confirmó que los errores se distribuyen aleatoriamente, sugiriendo que el modelo de regresión lineal es robusto ante variaciones experimentales. En cuanto a la especificidad del método cromatográfico, se observó que el analito se separa completamente de interferentes en condiciones normales, con un ángulo de pureza (PA) de 0,351 frente a un

Tabla VII.
Determinación de Dapirona en un medicamento

Muestra	Réplica	Contenido de Dapirona (mg/tab)	Promedio Cantidad de Dapirona (mg/tab)	Promedio Porcentaje Respecto al Declarado (%)
1	1	492,04	491,66	98,33
	2	491,27		
2	1	490,94	486,88	97,38
	2	482,81		
3	1	492,59	492,22	98,44
	2	491,84		
	Promedio	490,25	490,25	98,05
	DE	3,69	2,93	0,59
	%CV	0,75	0,60	0,60

umbral (TH) de 0,430. Sin embargo, bajo condiciones oxidativas, el PA aumentó a 0,759, indicando degradación y ausencia de Dapirona. En pruebas de hidrólisis y fotólisis, aunque hubo cambios en la coloración, el porcentaje de degradación se mantuvo por debajo del 10%, lo que sugiere que estos productos no interfieren con la medición. La precisión del sistema cromatográfico fue favorable, con un tiempo de retención promedio de 4,434 minutos y un coeficiente de variación (CV) del 0,123% tras inyectar una solución patrón cinco veces. La repetibilidad también se confirmó con un CV menor al 2%. En términos de precisión intermedia, las concentraciones porcentuales se mantuvieron entre 104,42% y 107,46%, dentro del rango aceptable. El análisis mediante el parámetro HoRat arrojó un valor de 1,68. La exactitud del método se reflejó en porcentajes de recuperación entre 98% y 102%, con un CV menor al 2%. Los coeficientes de determinación superiores a 0,999 indicaron una fuerte correlación entre las concentraciones estimadas y reales. La robustez del método fue confirmada mediante el

modelo Plackett-Burman, mostrando que variables como pH y composición no afectan significativamente el análisis. Los límites de detección y cuantificación fueron establecidos en 0,75 ppm y 2,28 ppm respectivamente. Finalmente, al analizar un medicamento vigente, todos los resultados se mantuvieron dentro del rango de aceptación del 90-110% en relación con la cantidad declarada por el fabricante.

Nuestros hallazgos coinciden por lo reportado por Contreras-Roura y col. (2021), quienes realizaron la validación de un método cromatográfico para la valoración del Metamizol sódico en la Dapirona-600 y el Espasmoforte (Dapirona inyectable) indicando que dicho método cumplió con los criterios de aceptación para cada parámetro de validación o desempeño evaluados y se empleó en el análisis de varios lotes de Dapirona-600 y un lote de Espasmoforte.

Los resultados demuestran que el método analítico es adecuado para el análisis rutinario y estudios de estabilidad

en tabletas que contienen Dipirona, asegurando así su calidad y seguridad para los pacientes.

Conclusiones

Se ha desarrollado un método analítico basado en cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para la cuantificación de dipirona en tabletas, logrando una separación efectiva con un factor de capacidad (K') de 1,300 y un tiempo de análisis de aproximadamente 4 minutos. Este método presenta linealidad en el rango de 0,008 a 0,0120 mg/mL ($R^2 \geq 0,999$) y es selectivo, permitiendo identificar y cuantificar el analito sin interferencias significativas. La precisión es alta, con un coeficiente de variación inferior al 2% y recuperaciones entre el 98% y el 102%. Además, se considera robusto bajo condiciones específicas de metanol, pH y flujo. Los límites de detección y cuantificación son 0,75 ppm y 2,28 ppm, respectivamente. La validación del método asegura su aplicabilidad en análisis rutinarios y control de calidad, cumpliendo con los criterios establecidos y garantizando resultados fiables. Se recomienda evitar la inyección de muestras más de 24 horas después de su preparación para prevenir impurezas.

Agradecimientos

Los autores agradecemos el apoyo brindado por los miembros del Laboratorio de Análisis de Medicamentos, Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela y la Fundación María Paula Alonso de Ruiz Martínez.

Referencias Bibliográficas

- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. 2005, Real Farmacopea Española. España.
- Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. 2013. Farmacopea Argentina. 7. Argentina.
- Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. 2010. Farmacopeia Brasileira. Brasilia.
- Buitrago-González TP, Calderon-Ospina CA, Vallejos-Narvaez, A. 2014. Dipirona: ¿Beneficios subestimados o riesgos sobredimensionados? Revisión de la literatura. *Rev Colomb Cienc Quim Farm* 43(1):173-195.
- British Pharmacopoeia Commission. 2020. British Pharmacopoeia.
- Chinesse Pharmacopoeia. 1990. Chinese Chemical Engineering Press. Beijing.
- Contreras-Roura J, Guach-Wilson S, Pérez-Martiatu S, Lafferte-García T, Hernández-Fernández Y. 2021. Validación de un método cromatográfico para la valoración del Metamizol sódico en la Dipirona-600 y el Espasmofoorte. *Revista CENIC Ciencias Químicas* 52(2): 161-181.
- Davrieux M, Gutiérrez S, Marín D, Pier D, Pais T. 2007. Agranulocitosis por dipirona: a propósito de un caso clínico. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 78(1):35-40.
- Farmacopea de los Estados Unidos (USP) 42. Validación de Procedimientos Farmacopeicos. 2019.
- Horwitz W, Albert RJ. 2006. The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision. *Assoc off Anal Chem* 89(4):1095-1109.
- International Conference Harmonisation (ICH) Harmonised tripartite guideline - Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1); London, 2005.
- International Union of Pure and Applied Chemistry. 2014. Compendium of Chemical Terminology (Gold Book). Versión 2.3.3. pp. 274-275.
- Machado-Alba J, Cardona-Trejos E, Sánchez-Morales L, Rodríguez-Ramírez, L. 2019. Identificación de reacciones adversas medicamentosas en pacientes tratados con dipirona en un hospital de tercer nivel. *Ces Medicina* 33:13-20.
- Quattrocchi O, Abelaira S, Laba R. 1992. Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Buenos Aires.

Disponible: file:///C:/Users/aster/Downloads/introduccion-a-la-hplc-aplicacion-y-practica-o-a-quattrocchi-s-a-de-andrizzi-r-f-laba_compress.pdf.

Tomidis Chatzimanouil MK, Goppelt I, Zeissig Y, Sachs UJ, Laass MW. 2023. Metamizole-induced

agranulocytosis (MIA): a mini review. Mol Cell Pediatr. 10(1):6.

USP 42. Apartado 1225. 2023. Validación de Procedimientos Farmacopeicos. Disponible: <https://es.scribd.com/document/681322145/USP-1225-Validacion-de-Metodologia>