

# Verificación del método de la Monografía de la Farmacopea de Estados Unidos con el espectrofotómetro UV-Vis Agilent Cary 60

Cuantificación de impurezas de hierro en sulfato de magnesio según la monografía de la Farmacopea de Estados Unidos



## **Autores**

Ciaran Worth, Wesam Alwan y  
Fabian Zieschang  
Agilent Technologies, Inc.

## **Resumen**

Este estudio describe cómo puede utilizarse el espectrofotómetro UV-Vis Agilent Cary 60 para verificar la Monografía de la Farmacopea de Estados Unidos (USP) para la cuantificación de impurezas de hierro en sulfato de magnesio. El espectrofotómetro UV-Vis Agilent Cary 60 se equipó con un intercambiador multicelda de 18 celdas, que permite el análisis automatizado de blancos, patrones y muestras bajo el control del software Agilent Cary WinUV. El método verificado se utilizó para determinar el peso relativo de hierro en dos muestras de sulfato de magnesio por debajo del límite especificado de 0,5 µg/g. Los resultados confirman la idoneidad del espectrofotómetro Cary 60 para aplicaciones de control de calidad relacionadas con el sector farmacéutico.

## Introducción

Las agencias públicas nacionales e internacionales regulan los productos farmacéuticos para garantizar la seguridad, eficacia, calidad y etiquetado de los medicamentos. Estas agencias publican monografías farmacéuticas para los desarrolladores y fabricantes de medicamentos, ayudándoles a mantener unos estándares de calidad coherentes durante los procesos de investigación, desarrollo y fabricación. Las principales farmacopeas, como la USP, la Farmacopea Europea (Ph. Eur.), la Farmacopea Británica (BP), la Farmacopea Japonesa (JP) y la Farmacopea de la República Popular China (ChP) publican monografías farmacéuticas como parte de sus compendios oficiales. Las monografías proporcionan métodos para la determinación cuantitativa de sustancias farmacéuticas, lo que incluye la medida de impurezas dentro de límites aceptables, y son fundamentales para el cumplimiento de los requisitos reglamentarios. La espectroscopia UV-Vis es una técnica especificada habitualmente en diversas monografías farmacéuticas.

De conformidad con las buenas prácticas de fabricación (GMP), cualquier técnica que se utilice para analizar sustancias farmacéuticas debe ser evaluada para determinar su idoneidad en las condiciones reales de uso. La USP proporciona información general sobre la verificación de los procedimientos compendiales en el Capítulo General <1226>, Verificación de los procedimientos compendiales, y orientación específica sobre las técnicas espectroscópicas UV-Vis en el Capítulo General <857>, Espectroscopia ultravioleta-visible, de la USP.<sup>1,2</sup>

En una nota de aplicación anterior, el **espectrofotómetro UV-Vis Cary 60** y el **software Cary WinUV** realizaron las medidas requeridas por muchos de los análisis de verificación descritos en el capítulo <857> de la USP.<sup>3</sup> Este estudio proporciona un ejemplo de cómo el espectrofotómetro UV-Vis Cary 60 equipado con un **intercambiador multicelda de 18 celdas** puede utilizarse para la verificación del método para la cuantificación del contenido de hierro en sulfato de magnesio según la monografía Sulfato de magnesio de la USP.<sup>4</sup>

## Espectrofotómetro UV-Vis Cary 60

El espectrofotómetro UV-Vis Cary 60 es un sistema UV-Vis flexible, potente y fiable, ideal para el análisis de rutina de diversas sustancias en laboratorios farmacéuticos (Figura 1). El espectrofotómetro UV-Vis Cary 60 combina una recogida de datos de alta calidad con un bajo coste de propiedad, debido fundamentalmente a su potente fuente de luz de lámpara de xenón. La robustez y la fiabilidad de la lámpara, como refleja su **garantía de 10 años**, reducen los posibles costes de sustitución y revalidación, y maximizan el tiempo de actividad del instrumento.

El espectrofotómetro UV-Vis Cary 60 se ha sometido a una auditoría independiente de impacto medioambiental y ha recibido la etiqueta **ACT de responsabilidad, coherencia y transparencia**, verificada por My Green Lab. La etiqueta proporciona información sobre el impacto medioambiental del espectrofotómetro UV-Vis Cary 60 durante todo su ciclo de vida.

El espectrofotómetro UV-Vis Cary 60 mejora el impacto medioambiental de los laboratorios sin que ello afecte a la productividad o al progreso científico.



**Figura 1.** El espectrofotómetro UV-Vis Agilent Cary 60 incluye una garantía de sustitución de 10 años para la lámpara de xenón.

## Experimento

### Reactivos

- **Ácido clorhídrico diluido (HCl):** 1 ml de HCl en 1000 ml de agua
- **Solución A:** 500 mg/ml de acetato de amonio en agua
- **Solución B:** 13,4 mg/ml de ácido ascórbico en agua
- **Reactivo de color:** 3,8 mg/ml de ácido 3-(2-piridil)-5,6-di-(2-furil)-1,2,4-triazina-5',5"-disulfónico, sal disódica
- **Solución madre de patrón de hierro:** 1,0 µg/ml de hierro en HCl diluido

### Preparación de la soluciones de blanco, patrón y muestra

La monografía Sulfato de magnesio de la USP<sup>4</sup> describe la cuantificación de la masa relativa de hierro en una muestra de sulfato de magnesio calculada a partir de una línea de mejor ajuste, basada en el análisis mediante el sistema UV-Vis de tres soluciones de patrón conocidas.

Todo el material de vidrio se lavó con HCl diluido. Se prepararon tres patrones transfiriendo 2,0, 5,0 y 10,0 ml de la solución madre de patrón de hierro a matraces volumétricos independientes de 50 ml y se diluyeron hasta 35 ml con HCl diluido. Se preparó una solución en blanco transfiriendo 35 ml de HCl diluido a un matraz volumétrico de 50 ml. Todas las soluciones madre se prepararon el día de los análisis.

Se prepararon dos soluciones de muestra transfiriendo 10 g de sulfato de magnesio (número de CAS 7487-88-9) a un matraz volumétrico de 50 ml y diluyendo hasta 35 ml con HCl diluido. Se determinó la concentración de hierro en las soluciones de muestra utilizando la curva de calibración específica para la matriz establecida.

**Tabla 1.** Patrones utilizados para calcular la masa relativa de hierro en sulfato de magnesio.

| Patrón   | Concentración de hierro (mg/l) | Masa de hierro en el patrón (µg) |
|----------|--------------------------------|----------------------------------|
| Patrón 1 | 0,04                           | 2                                |
| Patrón 2 | 0,1                            | 5                                |
| Patrón 3 | 0,2                            | 10                               |

### Instrumentos

Se equipó al espectrofotómetro UV-Vis Cary 60 con un intercambiador multicelda de 18 celdas y se controló mediante el software Cary WinUV. El intercambiador multicelda puede desplazarse automáticamente para que cada cubeta pueda posicionarse una tras otra, lo que permite la medida automatizada de hasta 18 celdas. Por lo tanto, el intercambiador multicelda permitió el análisis automático de varios patrones, muestras y repeticiones utilizando un solo método, lo que mejoró enormemente la productividad.<sup>5</sup> Las medidas se realizaron con celdas de 1 cm de longitud de paso a temperatura ambiente.

Se utilizó el software de aplicación de concentración Cary WinUV para recoger las medidas del blanco, el patrón y la muestra mediante la creación de un método de concentración. El método realizó automáticamente la sustracción del blanco, estableció una curva de concentración y calculó la concentración de hierro en las muestras. Los parámetros del método se describen en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Parámetros de la aplicación de concentración Agilent Cary WinUV utilizados para el método del espectrofotómetro UV-Vis Agilent Cary 60.

| Parámetro                         | Ajuste  |
|-----------------------------------|---------|
| Longitud de onda del análisis     | 594 nm* |
| Tiempo promedio de la señal (SAT) | 0,5 s   |
| Ancho de banda espectral (SBW)    | 1,5     |
| Número de patrones                | 3       |
| Número de muestras                | 2       |

\* Especificado en la monografía de la USP, Sulfato de magnesio<sup>4</sup>

## Resultados y comentarios

### Verificación del método

El proceso de verificación de los métodos UV-Vis, que se describe en el capítulo <857> de la USP<sup>2</sup>, incluye los siguientes requisitos:

**Exactitud de la medida:** La exactitud de la medida puede determinarse mediante estudios de recuperación de concentraciones conocidas del analito dentro de la matriz requerida.

La exactitud de la medida del análisis de hierro en sulfato de magnesio se determinó añadiendo tres muestras de patrón de sulfato de magnesio con una concentración nominal de 0,1 mg/l a 2, 4 y 6 ml de soluciones de patrón de hierro de 0,2 µg/ml. A continuación, se calculó la concentración de hierro recogiendo seis medidas repetidas (réplicas) y calculando la absorbancia media para cada solución añadida. Seguidamente se calculó el porcentaje de recuperación mediante la Ecuación 1.

#### Ecuación 1.

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{C_1}{C_2} \times 100$$

Donde:

C<sub>1</sub> = concentración medida

C<sub>2</sub> = concentración calculada

Los resultados de recuperación de 100 ± 6 % de la concentración esperada de hierro en sulfato de magnesio (Tabla 3) se hallaban dentro de los límites aceptables de 80,0 a 120,0 % establecidos en el capítulo <857> de la USP para la recuperación media en análisis de impurezas.

**Tabla 3.** Análisis de recuperación de tres muestras de sulfato de magnesio enriquecidas con un patrón de hierro (0,2 mg/l) a tres concentraciones utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Agilent Cary 60.

| Muestra de exactitud de sulfato de magnesio | Conc. nominal (mg/l) | Volumen de patrón añadido (ml) | Conc. calculada (mg/l) | Conc. medida (mg/l) | Recuperación (%) |
|---|----------------------|--------------------------------|------------------------|---------------------|------------------|
| 1   | 0,100                | 2                              | 0,1166                 | 0,1104              | 94,6             |
| 2   |                      | 4                              | 0,1286                 | 0,1218              | 94,8             |
| 3   |                      | 6                              | 0,1375                 | 0,1403              | 102,0            |

**Precisión de la medida:** La precisión o reproducibilidad puede determinarse midiendo la concentración de seis soluciones de muestra preparadas de forma similar al 100 % de la concentración de la prueba de ensayo y determinando su desviación estándar relativa (DER).

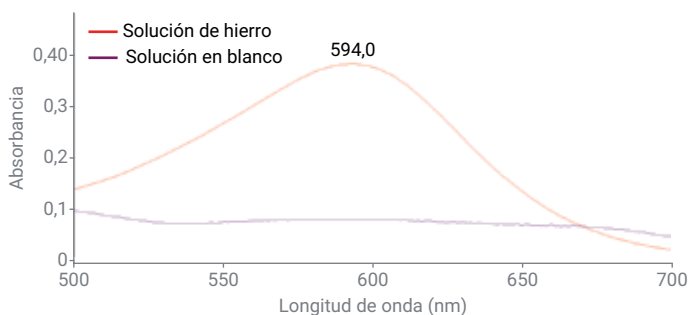
La exactitud del análisis de hierro en sulfato de magnesio se determinó dividiendo en seis porciones una solución de patrón con una concentración nominal de 10 µg de hierro en 50 ml de la matriz de análisis. A continuación, se midió la absorbancia de las seis porciones cargadas en el intercambiador de 18 celdas a 594 nm utilizando el espectrofotómetro UV-Vis Cary 60. La función de cálculo de promedios de las muestras del software de aplicación de concentración WinUV permitió medir las seis réplicas de las muestras en el mismo análisis. Se evaluó la reproducibilidad de las medidas calculando la DER de la concentración medida de cada muestra. Se determinó que la DER era del 1,8 %, porcentaje que se encuentra dentro del límite de no más de (NMT) 15,0 a 20,0 %, establecido en el capítulo <857> de la USP.

**Tabla 4.** Precisión de las medidas de hierro en seis réplicas de muestras de sulfato de magnesio.

| Muestra                  | Absorbancia | Concentración de la muestra (mg/l) |
|--------------------------|-------------|------------------------------------|
| Muestra 1-1              | 0,1864      | 0,1894                             |
| Muestra 1-2              | 0,1884      | 0,1924                             |
| Muestra 1-3              | 0,1929      | 0,1993                             |
| Muestra 1-4              | 0,1898      | 0,1946                             |
| Muestra 1-5              | 0,1881      | 0,1920                             |
| Muestra 1-6              | 0,1875      | 0,1911                             |
| Desviación estándar (DE) | 0,002276    | 0,00348                            |
| DER (%)                  | 1,205       | 1,802113                           |

**Especificidad:** La especificidad puede garantizarse demostrando la ausencia de interferencias en el rango espectral procedentes del patrón y de la matriz de la muestra.

Se realizaron barridos de número de onda de una solución en blanco y una solución de patrón de hierro con una concentración nominal de 0,2 mg/l en el software de aplicación de barrido Cary WinUV. La Figura 2 muestra una comparación de la respuesta fotométrica del reactivo de color [ácido 3-(2-piridil)-5,6-di-(2-furil)-1,2,4-triazina-5',5"-disulfónico, sal disódica] en una solución de hierro comparada con la misma solución sin hierro (solución en blanco) alrededor del pico objetivo a 594 nm. La solución en blanco no muestra respuesta fotométrica en el rango espectral de análisis, lo que indica que no hay interferencias en este rango.



**Figura 2.** Comparación de los barridos de longitud de onda entre un reactivo de color añadido a una solución que contiene hierro y el mismo reactivo añadido a una solución en blanco (sin hierro).

**Límite de cuantificación (LC):** El LC de hierro se estimó calculando la DE de seis medidas replicadas de una solución en blanco y multiplicando el valor por 10. Para este análisis, el LC estimado se calculó en 0,00231 mg/l. Para confirmar este límite de cuantificación estimado, la relación señal-ruido de esta medida en el límite debe ser superior a 10 y debe determinarse que la medida en esta concentración es exacta y precisa. En última instancia, el LC debe ser  $\leq 50\%$  del límite especificado en la monografía para considerarse válido.

**Tabla 5.** Concentraciones calculadas de seis medidas replicadas de una solución en blanco y el LC estimado de hierro.

| Réplica | Concentración (mg/l) |
|---------|----------------------|
| 1       | 0,00776              |
| 2       | 0,0075               |
| 3       | 0,00776              |
| 4       | 0,00802              |
| 5       | 0,00762              |
| 6       | 0,00736              |
| DE      | 0,000231             |
| LC      | 0,002319             |

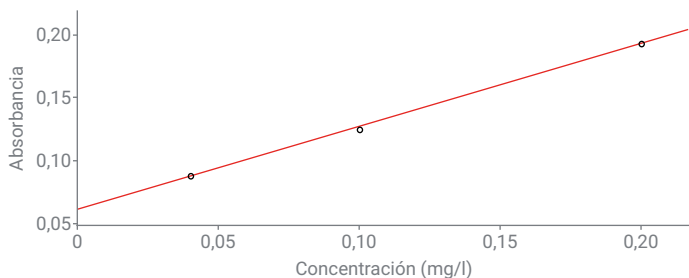
Teniendo en cuenta el éxito de la verificación del procedimiento del espectrofotómetro UV-Vis Cary 60, el análisis de hierro en sulfato de magnesio según la monografía USP puede realizarse con confianza. La verificación confirma que el instrumento y los parámetros experimentales son adecuados para las condiciones reales de uso.

### Medida de la masa relativa de hierro en sulfato de magnesio:

Para determinar la masa relativa de hierro en sulfato de magnesio, la monografía de la USP especifica que deben utilizarse los valores de absorbancia de tres soluciones de patrón de hierro en la matriz de análisis para crear una curva de calibración. La masa relativa de hierro en una muestra de sulfato de magnesio puede determinarse usando la Ecuación 2.

Para preparar la matriz de análisis, se añadieron 5 ml de la solución B y del reactivo de color a cada una de las soluciones en blanco, de muestra y de patrón (véase la sección Experimento). A continuación, se enrasó cada solución (50 ml) con HCl diluido.

Se midió la absorbancia de cada solución de patrón frente a la solución en blanco y se representó gráficamente frente a su contenido de hierro, como se muestra en la Figura 3.



**Figura 3.** Curva de calibración basada en la medida de tres soluciones de patrón de hierro específicas para la matriz con un espectrofotómetro UV-Vis Agilent Cary 60.

A continuación, se midieron los valores de absorbancia de dos soluciones de muestra y las lecturas se utilizaron para calcular el contenido de hierro en relación con la masa de sulfato de magnesio, según la Ecuación 2.

### Ecuación 2.

$$\text{Resultado} = \frac{C}{W}$$

Donde:

C = contenido de hierro en la solución de muestra ( $\mu\text{g}$ )

W = peso de sulfato de magnesio en la solución de muestra

**Tabla 6.** Contenido relativo de hierro en dos muestras de sulfato de magnesio.

| Muestra de sulfato de magnesio | Contenido de hierro ( $\mu\text{g}$ ) | Resultado ( $\mu\text{g/g}$ ) |
|--------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| Muestra 1                      | 3,1                                   | 0,31                          |
| Muestra 2                      | 2,5                                   | 0,25                          |

Los resultados de contenido de hierro se encuentran dentro de los criterios de aceptación NMT de  $0,5 \mu\text{g/g}$ , que es el límite superior especificado en la monografía de la USP.

## Conclusión

Se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis Agilent Cary 60 con un intercambiador de 18 celdas para demostrar cómo puede verificarse un procedimiento compendial UV-Vis de una monografía de la USP. El software Agilent Cary WinUV y el intercambiador de 18 celdas automatizaron las medidas de múltiples réplicas requeridas por los análisis de validación de la USP, reduciendo la carga de trabajo del usuario. Los análisis de validación incluyeron la confirmación de la exactitud, precisión y especificidad de la medida, así como la determinación del límite de cuantificación.

Tras verificar el método, se utilizó el espectrofotómetro UV-Vis Agilent Cary 60 para medir el contenido de hierro en dos muestras de sulfato de magnesio siguiendo el procedimiento compendial sobre el sulfato de magnesio de la USP. Los resultados cumplieron los criterios de aceptación para ese material (<0,5 µg/g).

El espectrofotómetro UV-Vis Agilent Cary 60 es ideal para flujos de trabajo de rutina de aseguramiento de la calidad/control de calidad (QA/QC) y aplicaciones de I+D en el sector farmacéutico. También está disponible el software opcional Agilent Cary WinUV Pharma, que permite el cumplimiento de la norma 21 CFR Parte 11 de la FDA de EE. UU., el Anexo 11 de la UE y otras normativas nacionales similares sobre registros electrónicos.

## Referencias

1. Farmacopea de Estados Unidos. Capítulo General <1226>, Verificación de procedimientos compendiales. USP-NF. Rockville, MD: Farmacopea de Estados Unidos, **2024**. DOI: [https://doi.org/10.31003/USPNF\\_M870\\_03\\_01](https://doi.org/10.31003/USPNF_M870_03_01)
2. Farmacopea de Estados Unidos. Capítulo General <857>, Espectroscopia ultravioleta-visible. USP-NF. Rockville, MD: Farmacopea de Estados Unidos, **2022**. DOI: [https://doi.org/10.31003/USPNF\\_M3209\\_03\\_01](https://doi.org/10.31003/USPNF_M3209_03_01)
3. Spectroscopy Solutions for Pharmaceuticals: Confidence in Compliance to USP <857> Using the Agilent Cary 60 UV-Vis Spectrophotometer, documento técnico informativo de Agilent Technologies, número de publicación 5991-7269EN, **2016**.
4. Farmacopea de Estados Unidos. Monografías de la USP, Sulfato de magnesio. USP-NF. Rockville, MD: Farmacopea de Estados Unidos, **2024**. DOI: [https://doi.usp.org/USPNF/USPNF\\_M47040\\_06\\_01.html](https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M47040_06_01.html)
5. Improved Lab Efficiency with the Agilent 18-Cell Changer Accessory, *resumen técnico de Agilent Technologies*, número de publicación 5994-7250EN, **2024**.

## Más información

- [Espectrofotómetro UV-Vis Cary 60](#)
- [Software Cary WinUV para aplicaciones UV-Vis](#)
- [Preguntas frecuentes sobre la espectroscopia y los espectrofotómetros UV-Vis](#)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

DE-001364

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2024  
Impreso en EE. UU., 12 de noviembre de 2024  
5994-6929ES