

# PRÉ-VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR HPLC-DAD PARA DETERMINAÇÃO DA NIFEDIPINA NA PRESENÇA DE SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

Maysa A. de **OLIVEIRA**<sup>1</sup> ; Kênnia Rocha **REZENDE**<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Aluna de pós-graduação em Ciências da Saúde – Nível Doutorado – Laboratório de Biofarmácia e Farmacocinética (BIOPK) – Faculdade de Farmácia – UFG, [maysa.a.oliveira@gmail.com](mailto:maysa.a.oliveira@gmail.com)

<sup>2</sup> Orientadora - Laboratório de Biofarmácia e Farmacocinética (BIOPK) – Faculdade de Farmácia – UFG, [kennia@gmail.com](mailto:kennia@gmail.com)

Palavras-chave: HPLC-DAD, nifedipina, produtos de degradação, validação.

## 1. INTRODUÇÃO

A nifedipina é utilizada no tratamento da angina de peito e da hipertensão arterial (SILVA, 2002). Após administração oral, esta é rapidamente e amplamente absorvida; seu efeito máximo é atingido entre 1-2 h, a biodisponibilidade varia de 80- 90%, com meia vida plasmática ( $t_{1/2}$ ) de 5 horas. O seu principal metabólito é o nitrofenilpiridina (dehidronifedipina), produto da oxidação hepática (STREEL et al., 1998). Na atualidade, as preparações farmacêuticas de nifedipina disponíveis são cápsulas gelatinosas (coloridas e opacas) e comprimidos revestidos. Essas preparações visam protegê-la da exposição à luz. No entanto, a matéria-prima não está sujeita à proteção e o produto acabado, apesar de farmacotecnicamente protegido, pode sofrer alterações durante fabricação, armazenamento e uso. Sadana e Ghogare (1991) observaram que a fotodegradação da nifedipina produz o nitrofenilpiridina e sua oxidação gera o nitrofenilpiridina, podendo comprometer sua ação terapêutica. Assim, os procedimentos analíticos de avaliação do teor dos produtos farmacêuticos devem ser necessariamente seletivos, visando à identificação e determinação de possíveis produtos de degradação. A Farmacopeia dos Estados Unidos (USP, 2008) preconiza o uso de HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) para determinação de nifedipina e dos seus produtos de degradação em matérias-primas. A fase móvel consiste de água, ACN e MeOH (50:25:25 v/v/v), coluna cromatográfica C18, fluxo de 1 mL/min e detecção a 235 nm. As Farmacopeias Britânica (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2007) e Européia (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008) preconizam que a determinação dos produtos de degradação da nifedipina em matérias-primas seja realizada por HPLC

(ACN, MeOH e água 9:36:55, C18, 1 mL/min, 235 nm). No entanto, indica que o teor de nifedipina seja realizado por titulação potenciométrica, apesar das técnicas cromatográficas serem, frequentemente, mais seletivas que esta na determinação de substâncias estruturalmente semelhantes. Neste contexto, é importante avaliar a influência destes produtos de degradação na farmacocinética da nifedipina. Vários trabalhos (PIETTA et al., 1981; STREEL et al., 1998; ABOU-AUDA et al., 2000; NIOPAS, I. et al., 2003; VERTZONI et al., 2006) descrevem ensaios bionálticos para determinação de nifedipina e para determinação simultânea da nifedipina e seu metabólito. No entanto, não foram encontrados trabalhos relacionados à influência do nitrosofenilpiridina no perfil farmacocinético da nifedipina. Dessa forma, os objetivos deste trabalho são o desenvolvimento e a validação de um método por HPLC-DAD para avaliação do perfil farmacocinético da nifedipina co-administrada com o nitrosofenilpiridina.

## **2. MATERIAS E MÉTODOS**

### 2.1 Equipamentos, coluna cromatográfica, condições cromatográficas e analíticas

A análise cromatográfica empregou sistema HPLC-DAD (SHIMADZU), equipado com injetor automático e coluna cromatográfica *Xterra* C18 250 x 4,6 mm, 5 µm endcapped (Waters). A fase móvel consistiu de água, ACN e MeOH 55:20:25, 1 mL/min, volume de injeção de 10 µL, a 235 nm. Empregou-se a extração líquido-líquido (ELL) para o isolamento da nifedipina do plasma. Os solventes avaliados foram éter etílico, acetonitrila, acetato de etila e, ainda, a mistura hexano e clorofórmio (70:30).

### 2.2 Reagentes, substâncias químicas e outros

Foram utilizados água ultrapura, metanol e acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker), nifedipina matéria-prima (doação), carbamazepina (Farmacopeia Brasileira), nitrosofenilpiridina (BIOPK), nitrofenilpiridina<sup>1</sup>, peróxido de hidrogênio 30 % (VETEC), hidróxido de sódio PA (PROQUIMIOS), acetato de etila PA (PROQUIMIOS), hexano PA (PROQUIMIOS), clorofórmio PA (IMPEX), éter etílico PA (VETEC) e plasma humano (INGOH).

---

<sup>1</sup> Solução de nifedipina em metanol (2 mg/mL) oxidada em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1:1)

## 2.3 Amostras

### 2.3.1 Preparo da solução estoque de nifedipina ( $SE_{NIF}$ )

A solução estoque de NIF foi preparada transferindo-se uma quantidade de NIF exatamente pesada (10 mg) para balão volumétrico (100 mL). A concentração final foi de 0,1mg/mL.

### 2.3.2 Preparo da solução estoque de carbamazepina ( $SE_{CBZ}$ )

A solução estoque de CBZ foi preparada transferindo-se uma quantidade de CBZ exatamente pesada (10 mg) para balão volumétrico (25 mL). A concentração final foi de 0,4mg/mL.

### 2.3.3 Preparo da solução contendo NIF e CBZ para adição ao plasma

As soluções de trabalho (ST) foram preparadas a partir das alíquotas da  $ST_{NIF}$  (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 e 800  $\mu$ L) e da  $ST_{CBZ}$  (100  $\mu$ L) diluídas em metanol para volume final de 1 mL. Alíquotas das STs (100  $\mu$ L) foram novamente diluídas até concentrações finais de NIF a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80  $\mu$ g/mL e de CBZ a 40  $\mu$ g/mL. A curva de calibração do método foi preparada a partir de amostras de plasma (10 mL) fortificadas com alíquotas das STs (100  $\mu$ L) e as concentrações finais de NIF foram de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 e 800 ng/mL e de CBZ de 400 ng/mL. Adicionalmente, a amostra zero foi obtida pela adição de CBZ (concentração final 400 ng/mL) ao plasma branco.

### 2.3.4 Extração líquido-líquido da nifedipina do plasma humano

Alíquotas de plasma (100  $\mu$ L) – branco, com CBZ (PI) e fortificadas com NIF - foram transferidas para tubos Eppendorf. Em seguida, adicionou-se NaOH 1M (10  $\mu$ L) e éter etílico (1000  $\mu$ L) sob agitação (vortex, 1 min) seguida de centrifugação (3 min, 6000 rpm). A fase orgânica foi transferida (800  $\mu$ L) para um tubo de ensaio e evaporada com  $N_2$  até seca. Em seguida, o resíduo foi reconstituído com metanol (250  $\mu$ L), homogeneizado (vortex, 10 seg); centrifugado (3 min, 3000 rpm) e injetado em HPLC (2x).

### 2.3.5 Recuperação da NIF e de CBZ (PI)

A eficiência do método de extração da NIF e CBZ em plasma foi quantificada avaliando-se a recuperação absoluta (analito extraído vs analito em solvente

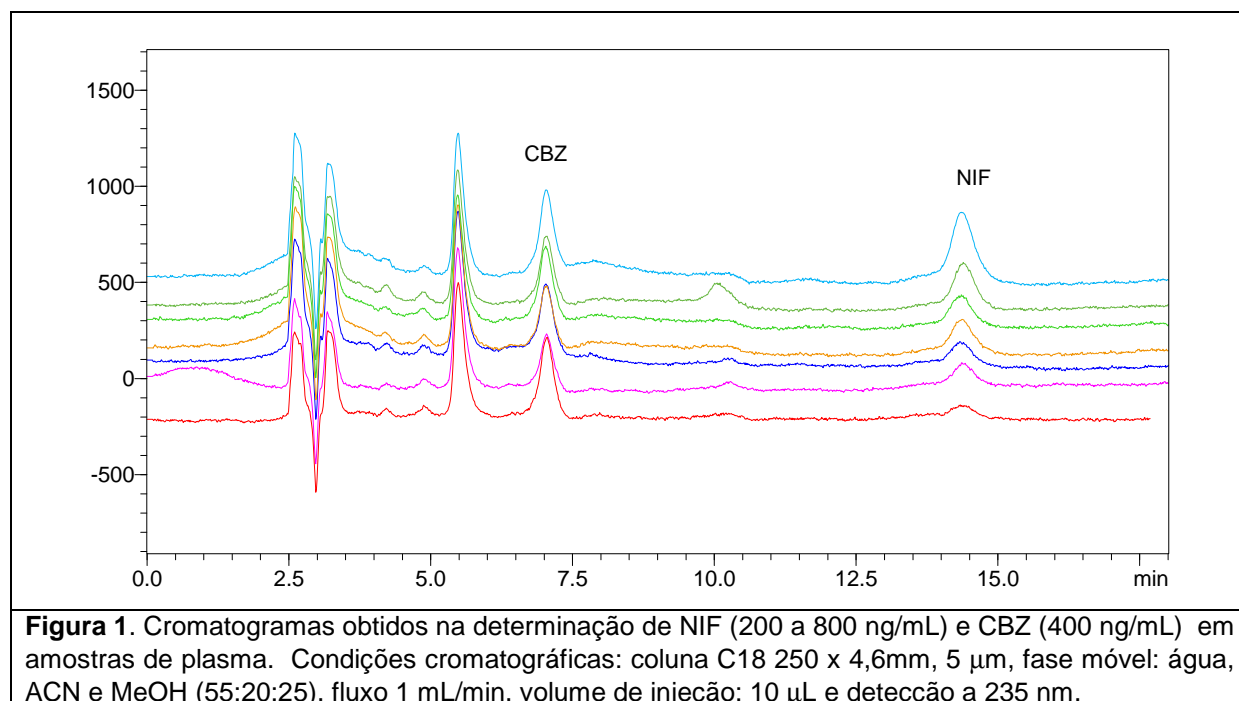
orgânico) nas concentrações de 200, 400 e 800 ng/mL para NIF e 300 ng/mL para CBZ.

### 2.3.6 Preparo das soluções de nitrosfenilpiridina e nifedipina oxidada

Para avaliação da seletividade foi preparada uma solução de nitrosfenilpiridina em metanol (175 ng/mL) e solução de nifedipina oxidada em metanol.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O método por HPLC-DAD desenvolvido demonstrou seletividade por ser capaz de separar a nifedipina do nitrosfenilpiridina e do nitrofenilpiridina. A linearidade foi verificada no intervalo de 200 a 800 ng/mL. A ELL foi empregada para extração da nifedipina do plasma e, dentre os solventes testados, o éter etílico foi escolhido por proporcionar maior recuperação tanto para nifedipina ( $87,2 \pm 7,9 \%$ ) quanto para o padrão interno ( $89,9 \pm 6,1 \%$ ). Em relação ao padrão interno, diazepam e carbamazepina foram avaliados e ambos apresentaram boa separação da nifedipina. Entretanto, a carbamazepina foi escolhida por apresentar menor tempo de retenção (TR = 7,1 min) que a nifedipina (TR = 14,4 min). Já o diazepam apresenta maior fator de retenção que a nifedipina, o que tornaria a análise cromatográfica mais longa. A figura 1 mostra os cromatogramas obtidos para determinação de NIF e CBZ em plasma.



**Figura 1.** Cromatogramas obtidos na determinação de NIF (200 a 800 ng/mL) e CBZ (400 ng/mL) em amostras de plasma. Condições cromatográficas: coluna C18 250 x 4,6mm, 5  $\mu$ m, fase móvel: água, ACN e MeOH (55:20:25), fluxo 1 mL/min, volume de injeção: 10  $\mu$ L e detecção a 235 nm.

#### 4. CONCLUSÃO

O método cromatográfico apresenta seletividade, linearidade e boa recuperação, no entanto deverá ser validado nos demais parâmetros para posterior avaliação da influência do nitrosfenilpiridina no perfil farmacocinético da nifedipina.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUD-AUDA, H.S.; NAJJAR, T.A.; AL-KHAMIS, K.I.; AL-HADIYA, B.M.; GHILZAI, N.M.; AL-FAWZAN, F. Liquid chromatographic assay of nifedipine in human plasma and its application to pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Oxford, v.22, p.241-249, 2000.

BRITISH PHARMACOPOEIA. London: The Stationary Office. Vol. I e II, 2007.

EUROPEAN PHARMACOPEIA. 6. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2008. p. 1590-1591.

NIOPAS, I.; DAFTSIOS, A. Determination of nifedipine in human plasma by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography: validation and application to pharmacokinetics studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Oxford v. 32, p. 1213-1218, 2003.

PIETTA, P.; RAVA, A.; BIONDI, P. High-performance liquid chromatography of nifedipine, its metabolites and photochemical degradation products. *Journal of Chromatography*, Amsterdam, v.210, p. 516-521, 1981.

SADANA, G.S. ; GHOGARE, A. B.; Mechanistic studies on photolytic degradation of nifedipine by use of <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy. *International Journal of Pharmaceutics*, Amsterdam, v. 70, p. 195-199, 1991.

SILVA, PENILDON. Farmacologia. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1374p.

STREEL, S.; ZIMMER, C.; SIBENALER, R.; CECCATO, A. Simultaneous determination of nifedipine and dehydronifedipine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, Amsterdam, v. 720, p. 119-128, 1998.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, 31. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2008.

VERTZONI, M.V.; REPPAS, C.; ARCHONTAKI, H.A. Sensitive and simple liquid chromatographic method with ultraviolet detection for the determination of nifedipine in canine plasma. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v.573-574, p. 298-304, 2006.