

Desarrollo y validación de un método de determinación por espectrofotometría visible de antimoniato de meglumina en inyectables

Jaime H. Rojas¹, Noralba Sierra¹, Eduardo Arboleda², Mario Bello²

¹ Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Bogotá, D.C., Colombia. Correo electrónico: jhrojasb@unal.edu.co

² Laboratorios ABJPharma, Bogotá, Colombia.

Recibido para evaluación: 19 de febrero de 2007

Aceptado para publicación: 10 de septiembre de 2007

RESUMEN

En este artículo se presentan los resultados del desarrollo y de la validación de un método analítico para realizar la determinación de antimoniato de meglumina en un inyectable para uso humano. El método se funda en la medida de la absorción a 352 nm de la coloración producida al hacer reaccionar el antimoniato de meglumina con yoduro de potasio en medio ácido. El método validado se desarrolló para hacer la determinación del antimoniato de meglumina como parte del control de calidad y para llevar a cabo estudios de estabilidad de la molécula en el inyectable. Como variables de validación se estudiaron la selectividad, la linealidad, la precisión, la exactitud y la robustez.

Palabras clave: Antimoniato de meglumina, espectrofotometría visible, validación.

SUMMARY

Development and validation of a colorimetric assay for the determination of meglumine antimoniate in injections

In this paper we present the results obtained during the development and validation of an analytical methodology by a colorimetric method for the assay of meglumine antimoniate in injections. The quantification implies the formation of a colored complex resulting after of meglumine antimoniate and potassium iodure in acid media. The absorbance was made at 352 nm. The validated methodology may be used as a part of quality control with release purpose and also, in chemical stability studies of the injections. As validation parameters, we studied selectivity, lineality, precision, accuracy and robustness.

Key words: Meglumine antimomiate, colorimetric assay, validation.

INTRODUCCIÓN

El antimoniato de meglumina se obtiene mediante un proceso de síntesis, en el cual el antimonio, por medio del oxígeno del carbono 3, se une a la meglumina. Este fármaco es un antiprotozoario bastante utilizado para el tratamiento de la leishmaniasis (1-3). Si bien este fármaco es de uso extendido, la estructura y el mecanismo de acción no están bien dilucidados (2). Dentro de los varios medicamentos utilizados para la terapia, otro de uso corriente es el estibogluconato de sodio. La enfermedad actualmente afecta a 12 millones de personas en el mundo y es endémica en 88 países de los cinco continentes, con un total de 350 millones de personas en riesgo. La inclusión de betaciclodextrina en las formulaciones con antimoniato de meglumina ha sido utilizada para aumentar la absorción (4). Los compuestos con antimonio en su estructura también se han utilizado para la terapia en caninos (5).

Los métodos analíticos para la determinación de antimonio en medicamentos no son muy variados. Trivelin y colaboradores (6) utilizan la formación de un par iónico entre el antimonio y la rodamina B y la extracción del par iónico con tolueno: el par iónico enseguida se determina por espectrofotometría visible. Martins y colaboradores (4) y Valladares y colaboradores (7) describen un método por absorción atómica con horno de grafito para la determinación de antimonio total en ratones y perros, respectivamente. En su estudio, Martins y colaboradores (4) desarrollan igualmente un método por ionización electrónica-espectrometría de masas para caracterizar y los complejos antimoniato de meglumina-ciclodextrina.

PARTE EXPERIMENTAL

Equipos

Espectrofotómetro Unicam UV-VIS 2, espectrofotómetro Unicam UV-VIS Helios.

Reactivos

Antimoniato de meglumina (MSb), yoduro de potasio Merck RA, yoduro de potasio Baker RA, yoduro de potasio Panreac, ácido clorhídrico Merck RA, trifluoruro de antimonio Merck RA.

Estandarización del método de análisis

En el proceso de estandarización de la metodología se encontró que la cantidad de producto formado era función del tiempo transcurrido entre la adición de la solución de ácido clorhídrico y la determinación lectura de absorbancia. Otro tanto se observó por cambios en las concentraciones utilizadas de yoduro de potasio y de ácido clorhídrico. Por tanto, se realizaron varios experimentos tendientes a optimizar dichas concentraciones, lo mismo que el momento de lectura de la absorbancia del com-

plejo formado, para el cual se estableció previamente su máximo de absorción. Este máximo se estableció en 352 nm. Las curvas cinéticas de absorbancia en función del tiempo permitieron fijar el tiempo óptimo de lectura en 10 minutos, contados a partir de la adición de ácido clorhídrico a la mezcla de antimonio de meglumina y yoduro de potasio.

Para establecer las concentraciones óptimas de los reactivos, de acuerdo con resultados previos, se prepararon soluciones concentradas de los reactivos, yoduro de potasio 2% y ácido clorhídrico 5N, para de éstas tomar diferentes volúmenes y seleccionar las concentraciones finales más adecuadas. Como resultado, y por cuestiones prácticas, se prepararon soluciones de yoduro de potasio al 1,75% y de ácido clorhídrico 3,75 N. Los volúmenes de estas soluciones para desarrollar la coloración se establecieron en 2 mL para cada uno de ellas, a las concentraciones estipuladas. El volumen final de la solución de lectura se estableció en 10 mL.

La metodología de esta forma estandarizada y en cuyas condiciones se procedió a su respectiva validación quedó establecida como sigue:

Antimonio de meglumina en solución: volumen o volúmenes adecuados.

Solución de yoduro de potasio 1,75%: 2 mililitros.

Solución de ácido clorhídrico 3,75N: 2 mililitros.

Agua destilada cantidad suficiente para: 10 mililitros.

A causa de la ligera coloración que produce la mezcla de reactivos, fue necesario preparar el respectivo blanco y determinar su absorción a los 10 minutos. Con el yoduro de potasio, se realizaron experiencias con tres marcas diferentes del reactivo, y no se encontraron diferencias en los resultados obtenidos por el empleo de una u otra marca. El proceso de validación se llevó a cabo con yoduro de potasio Panreac. A continuación se presentan y discuten los resultados obtenidos durante la etapa de validación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Especificidad

Primero se estudió la especificidad de la metodología frente a la mezcla de reactivos en las concentraciones ya establecidas, tomando como referencia el valor de absorción de una solución de antimonio de meglumina de concentración final 6 mcg/mL, contra agua como blanco. Para cuatro determinaciones se encontró una absorbancia promedio para el blanco de 0,041, y para el complejo de 0,440. También se determinó el espectro de absorción de una de las soluciones conformada únicamente por los reactivos o blanco de los reactivos y se observaron máximos de forma irregular en la región entre 200 y 270 nm, ligera absorción en la región entre 275 y 300 nm y

absorción un poco menor en la región de 350 nm. Por tanto, además de lo anotado más adelante, se estableció 352 nm como longitud de onda para la determinación del antimonio de meglumina.

De acuerdo con lo sugerido en la bibliografía (8), se establecieron como posibles productos de degradación del antimonio de meglumina los productos de la síntesis, la meglumina y el ion antimonio. Por consiguiente, se prepararon soluciones de meglumina y de una sal soluble de antimonio, el trifluoruro de antimonio. Estas soluciones se prepararon a una concentración calculada suponiendo el 100% de descomposición del antimonio de meglumina, de acuerdo con los pesos moleculares de éste, de la meglumina, del antimonio y del trifluoruro de antimonio. Como punto de referencia se empleó una solución de antimonio de meglumina. Una vez corregidas las absorbancias, no se encontró ningún tipo de interferencia. Tampoco se presentó interferencia respecto de los auxiliares de formulación, metabisulfito de potasio y sulfito de sodio. Las concentraciones empleadas en este caso fueron 5000 veces superiores a las concentraciones finales calculadas en la solución final coloreada según la formulación.

Linealidad

La curva de calibración para sistema se elaboró con concentraciones de antimonio de meglumina equivalentes a 2,7, 5,4, 8,1, 10,8 y 13,5 mcg/mL, mientras que para el método fueron 2,4, 3,6, 4,8 y 6,0 mcg/mL. Para cada caso se realizaron tres ensayos de manera independiente. En la tabla 1 se reportan los valores de absorbancia para cada una de las tres curvas de calibración del sistema realizada la corrección debida al blanco.

Tabla 1. Lecturas de absorbancia corregidas para la linealidad del sistema.

| C (mcg/mL) MSb | Curva 1 | Curva 2 | Curva 3 |
|-----------------------|----------------|----------------|----------------|
| 2,7 | 0,153 | 0,176 | 0,167 |
| 5,4 | 0,361 | 0,355 | 0,354 |
| 8,1 | 0,506 | 0,551 | 0,517 |
| 10,8 | 0,655 | 0,680 | 0,704 |
| 13,5 | 0,819 | 0,818 | 0,841 |

Para la corrección se tuvo en cuenta el promedio de los valores de absorbancia de tres blancos preparados paralelamente. Estos valores fueron 0,074, 0,051 y 0,098, con un valor promedio de 0,0743. La curva de calibración obtenida para las tres réplicas se presenta en la figura 1. Como ecuación de la recta se encontró $Y = 0,0609X + 0,0172$, $r^2 = 0,9935$.

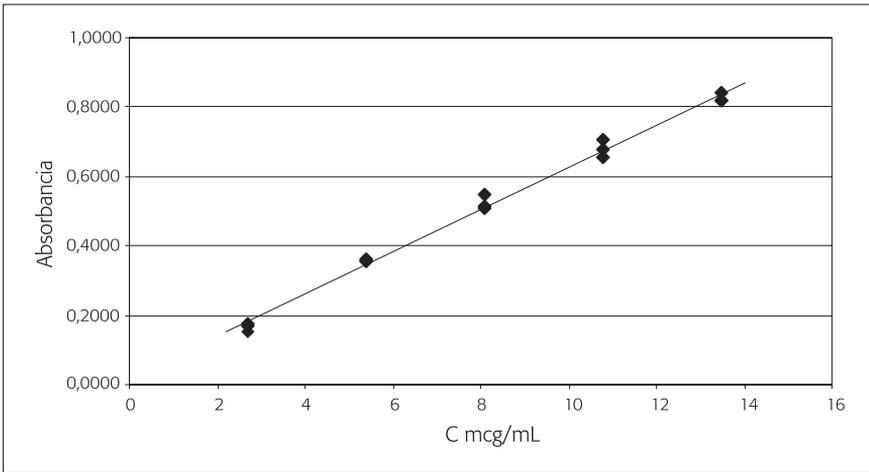


Figura 1. Curva de calibración para la linealidad del sistema, cinco concentraciones, tres réplicas.

La curva de calibración para el método se representa en la figura 2.

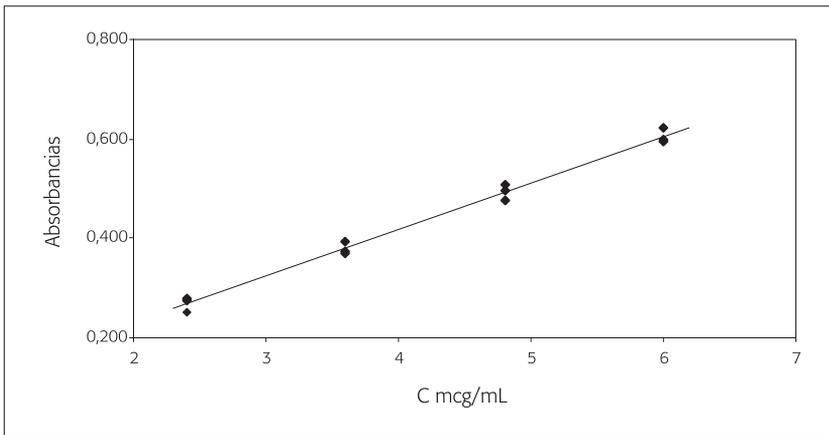


Figura 2. Curva de calibración para la linealidad del método, cuatro concentraciones, tres réplicas.

Tras hacer la corrección debida al blanco (0,1302, $n = 3$) y el ajuste de la recta por mínimos cuadrados, como ecuación de la recta se encontró $Y = 0,0093X + 0,044$, $r^2 = 0,9906$.

En la tabla 2, se encuentra el análisis estadístico de acuerdo a la prueba de t de Student para intercepto y pendiente, y los valores de F hallados según la prueba F de Fisher para la regresión y para la falta de ajuste (desvío de la linealidad). Las rectas de regresión y las pruebas de Student para pendientes e interceptos indicaron en los dos

casos regresiones significativas, un intercepto no significativamente diferente de cero para el sistema y un intercepto significativamente diferente para el método. La prueba de Fisher demostró en los dos casos que la falta de ajuste no fue significativa.

Tabla 2. Valores de intercepto y pendiente para la linealidad del sistema y del método.

| Prueba | Parámetro | Sistema | | | Método | | |
|--------|------------------------|---------|-------|---------|---------|-------|-------|
| | | t | LS | LI | t | LS | LI |
| t | Intercepto | 1,411 | 0,043 | - 0,009 | 3,86 | 0,071 | 0,016 |
| | Pendiente | 44,71 | 0,064 | 0,058 | 32,39 | 0,010 | 0,087 |
| | Coef. Deter. | 0,9935 | | | 0,9906 | | |
| F | Regresión ¹ | 1998,62 | | | 1049,09 | | |
| | Ajuste ² | 2,66 | | | 0,012 | | |

Sistema: t tab (13, 0.05): 2,160, ¹F tab (1/13) = 4,67, ²F tab (3/10) = 3,71.

Método: t tab (10, 0.05): 2,228, ¹F tab (1/10) = 4.96, ²F tab (1/8) = 4,46.

Para el caso del método, se preparó en el laboratorio una muestra según la formulación del producto.

Precisión

Para evaluar la precisión del sistema en el aspecto de repetibilidad, se trabajaron tres niveles de concentración, 4,5, 6,0 y 7,5 mcg/mL, y se hicieron tres determinaciones para cada uno de ellos. En la tabla 3 se presentan los resultados de la correspondiente evaluación de los parámetros de dispersión de acuerdo con los datos de la tabla anterior.

Tabla 3. Parámetros de dispersión para la repetibilidad del sistema y del método.

| C (mcg/mL) | Sistema | | C (mcg/mL) | Método | |
|------------|---------------------|---------------------------|------------|---------------------|---------------------------|
| | Desviación estándar | Coefficiente de variación | | Desviación estándar | Coefficiente de variación |
| MSb | | | MSb | | |
| 4,5 | 0,00929 | 2,22% | 3,15 | 0,0640 | 1,42 % |
| 6,0 | 0,00115 | 0,22% | 4,20 | 0,0121 | 2,18 % |
| 7,5 | 0,00108 | 1,66% | 5,25 | 0,0112 | 1,67 % |

Tal como se deduce de los valores de desviación estándar relativa o coeficientes de variación, la precisión del sistema es aceptable de acuerdo con lo recomendado por la literatura (9, 10).

Al realizar la prueba de Cochran utilizando los valores de desviación estándar relativa, se encontró un valor de G experimental de 0,747 para el sistema y de 0,414 para el método, valores inferiores al valor G de la tabla para $n = 3$ y $k = 3$. Este valor es de 0,879. Así, se concluye que el nivel de concentración no afecta la varianza de los resultados y los experimentos se consideran aceptables, por lo que se pueden combinar las varianzas individuales. La desviación estándar combinada del ensayo es de 1,97 % para el sistema y de 1,76 % para el método, valores inferiores a 3 %, recomendado por la farmacopea americana y por la Conferencia Internacional de Armonización para Métodos Espectrofotométricos (9, 10).

La evaluación de la precisión intermedia del sistema se realizó entre días y para una concentración de 6 mcg/mL, con seis determinaciones para cada uno de dos días. Los resultados (Tabla 4) indican que no existe diferencia significativa entre días (el valor hallado es menor del tabulado).

Tabla 4. Análisis de varianza para la precisión intermedia del sistema.

| Fuente | Gl | SC | CM | Fc | F tabla |
|--------|----|----------|----------|--------|---------|
| Día | 1 | 0,00003 | 0,00003 | 0,2447 | 4,96 |
| Error | 10 | 0,001226 | 0,000123 | - | - |
| Total | 11 | 0,001256 | - | - | - |

$F_{\text{tab}}(1/10) = 4,96$.

Robustez

Para el estudio de robustez de la metodología, se tomaron como referencia las recomendaciones de Youden y Steiner (11) adoptadas luego por Plackett y Burman (12), y lo publicado por Vander y colaboradores (13).

De acuerdo con Vander y colaboradores (13), para su validez estadística el estudio requiere que el diseño experimental incluya al menos siete factores reales, los cuales se evalúan mediante la realización de ocho experimentos independientes. En caso de no disponer de todos los factores reales, para completarlos se pueden incluir factores simulados o distractores como, por ejemplo, el sonido de un timbre. Por supuesto, el resultado obtenido con cualquiera de estos factores simulados no es relevante. Los ocho ensayos se realizaron a una concentración final de 6 mcg/mL. Como factores para el estudio se contemplaron cinco factores reales y dos factores simulados: concentración del yoduro de potasio, concentración del ácido clorhídrico, equipo, tiempo de lectura, longitud de onda de la determinación, factor simulado 1 y factor simulado 2. Los niveles del estudio para cada factor real se presentan en la tabla 5. Los valores del nivel 1, designados como positivos, corresponden a los valores o condiciones en las cuales se validó el método y se conocen como valores nominales, mientras que los del nivel 2, o negativos, son los valores alternativos.

Tabla 5. Niveles de los factores para el estudio de robustez.

| Factor | Nivel 1 (+) | Nivel 2 (-) |
|-------------------|----------------------|----------------------|
| Yoduro de potasio | 2000 mL | 1750 mL |
| Acido clorhídrico | 2000 mL | 1750 mL |
| Equipo | UV 2 | Helios |
| Tiempo de lectura | 10 minutos | 8 minutos |
| Longitud de onda | 352 nm | 350 nm |

Para cada ensayo se realizaron tres determinaciones y tres blancos. Los valores individuales de absorbancia para cada ensayo y para los blancos determinados simultáneamente se emplearon para calcular el valor de la absorbancia neta. Para establecer la variación en los resultados por cambios en los factores que puedan presentarse durante el proceso de determinación del antimoniato de meglumina, se calculó para cada factor la diferencia entre la media de los valores de respuesta obtenidos para el nivel superior del efecto y la media de los valores de respuesta obtenidos para el nivel inferior del efecto. En la tabla 6 se presentan los valores de las diferencias para cada factor. La diferencia se toma como valor absoluto.

Tabla 6. Valores de las diferencias encontradas.

| Factor | Diferencia |
|--------------------|-------------------|
| Yoduro de potasio | 0,02042 |
| Equipo | -0,00892 |
| Factor simulado I | 0,01725 |
| Tiempo de lectura | 0,03092 |
| Acido clorhídrico | 0,05025 |
| Factor simulado II | 0,01542 |
| Longitud de onda | 0,01792 |

Valor de referencia: $1,4142 \times 0,0150 = 0,0212$.

Según la bibliografía (12), los parámetros que se consideran críticos y a los cuales se debe prestar especial atención durante los ensayos de valoración, serán aquellos que presenten un valor para la diferencia mayor de 0,0212. Este valor corresponde a la desviación estándar (0,0150) de 6 ensayos, realizados bajo valores nominales, con una concentración de antimoniato de meglumina de 8 mcg/mL multiplicada por la raíz de 2. De esta forma, los factores que resultaron críticos fueron el tiempo de lectura y la concentración de ácido clorhídrico.

Aplicación

La metodología se aplicó para determinar el contenido de antimonio de meglumina de dos lotes piloto como parte de su control de calidad. Los dos lotes piloto fueron, por otra parte, sometidos a un estudio de estabilidad, para lo cual se almacenaron durante tres meses a 30 y a 40 °C, utilizando igualmente para este propósito la metodología descrita y validada. El contenido inicial (día cero) de los dos lotes 1 y 2 se estableció en 1,546 y 1,572 gramos /5 mL respectivamente, promedio de tres determinaciones independientes. En la tabla 7 se presentan los resultados obtenidos para el contenido de antimonio de meglumina durante el estudio. El número de réplicas no fue constante, realizando dos como mínimo.

Tabla 7. Concentración remanente de antimonio de meglumina en función del tiempo de almacenamiento¹.

| Lote piloto | Tiempo | 30 °C | 40 °C |
|-------------|---------|-------|-------|
| 1 | 15 días | 1,541 | 1,501 |
| | 30 días | 1,494 | 1,489 |
| | 56 días | 1,575 | 1,517 |
| | 90 días | 1,568 | 1,544 |
| 2 | 15 días | 1,574 | 1,506 |
| | 30 días | 1,530 | 1,513 |
| | 56 días | 1,557 | 1,547 |
| | 90 días | 1,557 | 1,559 |

¹ Gramos/5 mL.

El estudio de los resultados indicó que en ningún caso se presentó un efecto cinético o deletéreo sobre el contenido de antimonio de meglumina por acción de la temperatura. Como ejemplo se presentan en la gráfica de la figura 3 los resultados para el lote piloto 1 a 40 °C.

Como resultado del perfil obtenido se planteó la necesidad de realizar un análisis de varianza para todos los datos obtenidos de contenido de antimonio de meglumina en función del tiempo de almacenamiento. Este análisis permite establecer cualquier diferencia significativa entre el contenido inicial de antimonio de meglumina y los contenidos encontrados en función del tiempo para las dos temperaturas. En la tabla 8 se resumen los valores de F experimentales y los valores críticos de F para una probabilidad de error del 5%. En la tabla, N corresponde en cada caso al número total de determinaciones.

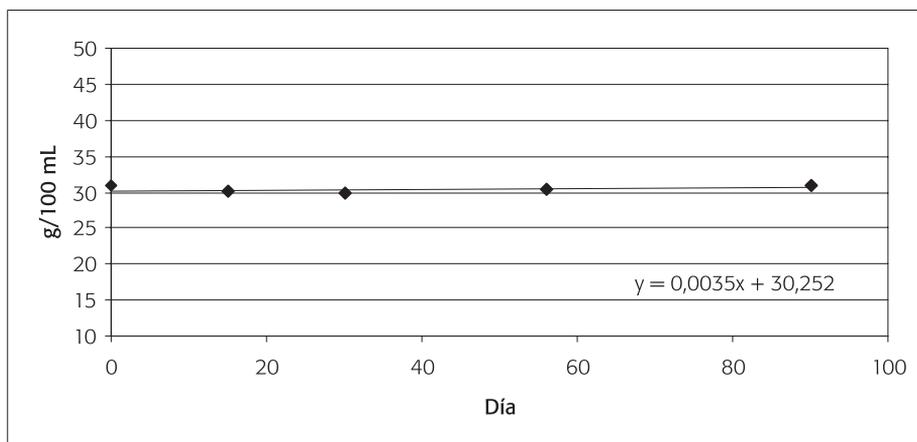


Figura 3. Contenido de antimoniato de meglumina en función del tiempo de incubación para el lote piloto 1, 40 °C.

Tabla 8. Valores de F para el análisis de varianza de los resultados del estudio de estabilidad.

| Lote piloto | T °C | N | G.L.* | F calculado | F tabla ($\alpha = 0,05$) |
|-------------|------|----|--------|-------------|-----------------------------|
| 1 | 30 | 15 | 4 ; 10 | 1,250 | 3,478 |
| | 40 | 16 | 4 ; 11 | 0,473 | 3,357 |
| 2 | 30 | 14 | 4 ; 9 | 0,480 | 3,630 |
| | 40 | 14 | 4 ; 9 | 0,562 | 3,630 |

* Grados de libertad (entre días; dentro de los días).

De acuerdo con los resultados de la tabla, estadísticamente se comprueba que los contenidos de antimoniato de meglumina para los dos lotes a cada una de las dos temperaturas y dentro de los tres meses del estudio no difieren significativamente del contenido inicial (en todos los casos el valor de F experimental o calculado es menor que el valor F de la tabla). Teniendo en cuenta que el Invima (Instituto Nacional de Vigilancia y Control de Medicamentos y Alimentos) otorga tiempos de vida de dos años como máximo, aunque los estudios de estabilidad puedan indicar un tiempo superior, se estableció en ese período el tiempo de vida del fármaco.

CONCLUSIONES

Se desarrolló y validó una metodología analítica sencilla y rápida para la determinación cuantitativa de antimoniato de meglumina en un producto inyectable utilizado para el

tratamiento de la leishmaniasis. La metodología validada cumple con características de especificidad, linealidad y precisión. En cuanto a la robustez de la metodología, ésta puede verse afectada por la concentración del ácido clorhídrico empleado para proporcionar el medio ácido que requiere la reacción y por el tiempo en el que se realice la medida de la absorbancia del producto formado. Por otra parte, el cambio de equipo y la introducción de pequeños cambios en la concentración del yoduro de potasio o en la longitud de onda de la determinación no afectaron los resultados obtenidos. La metodología se puede emplear para controlar la calidad del inyectable y, como se demostró, para hacer estudios de estabilidad del producto.

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, a su dependencia de Asesorías y Servicios y al propietario del registro sanitario del medicamento, Laboratorios Abjpharma de Bogotá, Colombia, al permitir la publicación de los resultados analíticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. http://www.drugs.com/cons/Meglumina_Antimoniate/html, fecha de consulta: noviembre de 2006.
2. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822001000100017, fecha de consulta: agosto de 2007.
3. S. S. Dزامیتیکا, C. Falcao, F. de Oliveira, C. Marbeuf, A. Garnier-Suillerot, C. Demicheli, B. Rossi-Bergmann, F. Frézard, Role of residual Sb(III) in meglumine antimoniate cytotoxicity and MRP-1 mediated resistance, *Chemico-Biological Interactions*, **160**, 217 (2006).
4. P. S. Martins, R. Ochoa, A. M. C. Pimienta, L. A. M. Ferreira, A. L. Melo, J. da Silva, R. Sinisterra, C. Demicheli, F. Frézard, Mode of action of β -cyclodextrin as an absorption enhancer of the water-soluble drug meglumine antimoniate, *International Journal of Pharmaceutics*, **325**, 39 (2006).
5. G. Baneth, S. E. Shaw, Chemotherapy of canine leishmaniasis, *Veterinary Parasitology*, **106**, 315 (2002).
6. L. A. Trivelin, J. Rodríguez, S. Rath, Determination of pentavalent antimony in antileishmaniotic drugs using an automated system for liquid-liquid extraction with on-line detection, *Talanta*, **68**, 1536 (2006).

7. J. E. Valladares, C. Riera, J. Alberola, M. Gallego, M. Portús, C. Cristofol, C. Franquelo, M. Arboix, Pharmacokinetics of meglumine antimoniate after administration of a multiple dose in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*, *Veterinary Parasitology*, **75**, 33 (1998).
8. LC-CG, Validation of Analytical Methods: Review and Strategy, febrero de 1998.
9. The United States Pharmacopeia, USP 29, The Pharmacopeia Convention Inc., Rockville, USA, pp. 588, 2006.
10. ICH, Validation of Analytical Procedures, octubre de 1993.
11. W. J. Youden, The Collaborative Test, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**, 195 (1990).
12. O. A. Quatrochi, S. I. Abelaira, R. F. Laba, *Introducción a la HPLC, teoría y práctica*, Buenos Aires, 1992.
13. Y. Vander y col., *Guidance for Robustness/Ruggedness*, Universidad de Bruselas, Bélgica, 2003.