

Aplicación de un sistema por inyección en flujo a la determinación cuantitativa de astemizol en formas farmacéuticas sólidas.

OVALLES, D. J. F., LEÓN, L. A., BUCHHEISTER, M. M. Y LUNA J. R.

Laboratorio de Análisis de Medicamentos, Facultad de Farmacia, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

RESUMEN

Se desarrolló un método analítico para cuantificar astemizol en tabletas, mediante la aplicación de un sistema por inyección en flujo y detección espectrofotométrica (UV) directa. El astemizol se separó de los excipientes directamente con metanol. Las disoluciones se inyectaron en un flujo continuo constituido por una solución de ácido clorhídrico 0,1 M. El intervalo lineal, obtenido usando el método de adición estándar, resultó entre 20 y 100 $\mu\text{g/mL}$, con un límite de detección igual a 0,01 $\mu\text{g/mL}$. El sistema se automatizó para determinar soluciones muestra a una velocidad de 1/min con un coeficiente de variación menor que 1,5% ($n = 25$). El método desarrollado resultó económico, rápido, reproducible y fácil de aplicar en aquellos laboratorios que realizan un elevado número de análisis de rutina.

ABSTRACT

A continuous flow injection method for determining astemizole in dosage forms is suggested. Direct UV-spectrophotometry was used as detection method. Methanol was used to extract astemizole from the dosage forms. Samples were injected directly into the carrier stream (HCl 0.1 M). The lineal interval was obtained using the standard addition method with a detection limit of about 0.01 $\mu\text{g/mL}$. The procedure is automated and samples (20 - 100 $\mu\text{g/mL}$) can be analyzed at a rate of 1/min with a coefficient of variation of less than 1.5% ($n = 25$). The method was economic, quick, reproducible and easy to apply in those laboratories that carry out a high number of routine analysis.

PALABRAS CLAVE

Astemizol, Astemizole, Análisis por inyección en flujo, Espectrofotometría UV.

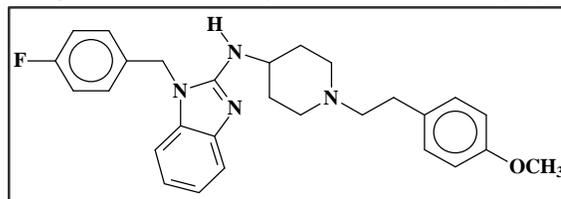
AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela, por financiar esta investigación (FA-239-99-C). Al Laboratorio de Análisis de Medicamentos de la Facultad de Farmacia donde se realizó este trabajo.

INTRODUCCIÓN

El Hismanal[®] fue desarrollado por Janssen Pharmaceutica (Bélgica), e introducido en la terapéutica en 1983 bajo el nombre genérico de astemizol (AZ) [Al-Obaid y Mian, 1991]. El AZ es un fármaco estructuralmente derivado del 2-aminobenzimidazol (Fig. 1), de nombre químico, 1-(p-Fluorobenzyl-2-[[1-(p-methoxyphenethyl)-4-piperidyl]-amino]-benzimidazole. Terapéuticamente, está indicado como antihistamínico de larga duración, desprovisto de efectos sedantes y anticolinérgicos. Se le considera un bloqueador específico de los receptores H1 de la histamina [Spilva y Mukhtans, 2001].

Figura 1. Estructura química del astemizol (AZ)



Se han descrito varios métodos para el análisis de AZ en formas farmacéuticas y matrices biológicas [Al-Obaid y Mian, 1991]. El análisis de AZ en formas farmacéuticas sólidas se realiza por cromatografía líquida de alta resolución [Sadana y Potdar, 1989] [Suryanarayana et al., 1993]. En los últimos diez años se han publicado algunos métodos alternativos para el análisis de AZ en formas farmacéuticas sólidas, sin embargo, llama la atención que éstos se hayan centrado

en la formación de un derivado, o un par iónico o un complejo de AZ, sin tratar de determinar AZ directamente por espectrofotometría UV [El Walily et al., 1995] [Qureshi y Khan, 1996] [Abdelmagedd, 1996] [Sastry y Naidu, 1997] [Sastry y Naidu, 1998] [Kelani et al., 1999] [Daabees, 1999]. También resulta interesante la ausencia de métodos rápidos, automáticos y económicos que permitan el control de calidad del AZ en tabletas. Hoy día, se conoce que el método oficial para determinar AZ en tabletas es por cromatografía líquida de alta resolución [USP XXIV, 2000], sin embargo, desde el punto de vista económico puede resultar prohibitivo para algunos laboratorios. Con el objetivo de responder a la inquietud planteada, se describe aquí un método rápido y automático aplicado a la determinación directa de AZ en tabletas. En este contexto, se utilizó un sistema por inyección en flujo continuo desarrollado por los autores [León et al., 2001] y detección directa por espectrofotometría UV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y materiales

Metanol, grado HPLC, (JTB). Ácido clorhídrico, grado analítico (Riedel-de Haën). Agua destilada grado Milli-Q. Astemizole patrón, Batch N° 0451093 de Trident Organics Private Limited (Dr. Reddy's Group). Materia prima valorada de Astemizol comparada con el patrón de astemizol RS de la USP, lote 020/96, Barcelona, España (Biofina c.a.) Astemizol genérico, comprimidos de 10 mg, lote 011252 (Lab. Genven). Dispositivo para filtración de polietileno Millex HV con membrana de filtración Durapore 0,45 mm.

Instrumentación

Sistema de bombeo peristáltico. Control digital MasterFlex L/S, modelo 7523-50), Cartidge pump 4, MasterFlex L/S, modelo 7519-06 y Cabezal de bomba de canales múltiples, modelo 7519-6. Tubería MasterFlex, tipo Tygon Lab L/S 14 (diámetro interno 1,6 mm) Lote N° 104150, R-3603, N° 6409 (todos de Cole-Palmer Instrument CO. U.S.A.).

Inyector. Válvula tipo rheodyne, de seis puertos para HPLC (U.S.A.).

Cubeta. Celda de cuarzo diseñada para flujo continuo, modelo Quartz Spectrophotometer cell, Semi Micro Flow thr, 10 mm, Z8.5; 73.65F-Q-10/Z8.5 (Atascadero, U.S.A.).

Detector. Espectrofotómetro UV-visible Lamda 11 (Perkin-Elmer Corporation), acoplado con el programa computadorizado UV WinLab (Microsoft Corporation, Perkin-Elmer GbhM).

Preparación de las soluciones

Solución patrón madre: se transfirió 0,2500 g de AZ patrón a un matraz volumétrico de 100 mL con ayuda de metanol, se diluyó, se colocó en un equipo ultrasonido por 15 minutos, se enfrió y llevó a volumen con el mismo disolvente.

Soluciones patrón de trabajo: se midieron alícuotas apropiadas (0, 250, 500, 750 y 1000 μ L respectivamente) de la solución patrón madre y se transfirieron, en cada caso, a un matraz volumétrico de 25 mL de capacidad conjuntamente con una porción de metanol en cantidad suficiente para 1,25 mL, inmediatamente se llevaron a volumen con solución de ácido clorhídrico 0,1 M.

Solución muestra: se pesó el contenido total de cada producto farmacéutico, 10 tabletas (Muestra 1 = 1,2288 g, Muestra 2 = 1,2288 g y Muestra 3 = 1,2330 g), después de triturar y pulverizar se pesó una muestra equivalente a 31,25 mg de AZ, la cual se transfirió a un matraz volumétrico de 50 mL de capacidad con ayuda de 40 mL de metanol absoluto, se colocó en un aparato ultrasonido durante 15 minutos, se enfrió y llevó a volumen con el mismo disolvente.

Solución muestra de trabajo: a partir de cada una de las soluciones muestra filtradas se prepararon soluciones muestra de trabajo equivalentes a 31,25; 37,50 y 62,50 μ g/mL respectivamente, diluidas con ácido clorhídrico 0,1 M y corregidas en términos del volumen final de metanol.

Soluciones de trabajo por el método de adición estándar: se adicionó diferentes volúmenes de la disolución patrón a varias alícuotas de la muestra del mismo tamaño (20 μ g/mL) y se corrigieron en términos del volumen final de metanol, después cada disolución se diluyó y llevó a un volumen fijo (25 mL) con ácido clorhídrico 0,1 M para obtener 0, 20, 40, 60 y 80 μ g/mL de AZ patrón respectivamente.

Optimización de los parámetros

Detección. El equipo espectrofotométrico se calibró de la manera usual recomendada por el fabricante. La longitud de onda máxima de absorción del AZ se determinó, por separado, en metanol y solución de ácido clorhídrico 0,1 M y luego se comparó con los datos reportados por Al-Obaid y Mian (1991). La longitud de onda analítica se determinó usando una de las soluciones patrones de trabajo.

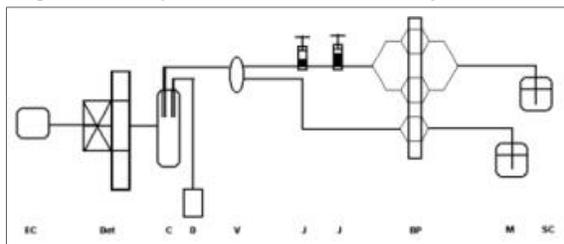
Composición del sistema de transporte. La viabilidad de varios disolventes acuosos, a diferentes pH, se estudiaron como medios de transporte del analito. Inyección. La válvula se giró 60°, en el momento de la inyección, y se regresó a su posición inicial antes de que el pico llegara a la línea base.

Flujo continuo. Consistió en bombear continuamente un solvente cargador y la disolución muestra, antes de la inyección. En ocasiones, con el fin de ahorrar muestra y lavar los tubos entre inyección e inyección se utilizó un sistema manual de interrupción de flujo (aire-muestra-aire).

Longitud del bucle de muestra (loop). Se ensayaron longitudes entre 25 y 100 cm utilizando un microtubo (1 mL/0,15 cm). Velocidad de flujo. El efecto de la velocidad de flujo se midió en términos del caudal de flujo por rodillo, tanto para el solvente portador, como para la muestra, entre 4 y 16 mL/min/rodillo.

Reducción de la pulsación generada por la bomba peristáltica. Los autores diseñaron un sistema para compensar las pulsaciones antes de que el flujo ingresara a la válvula de inyección. El sistema consistió en conectar a la manguera portadora del solvente una llave en forma de "T" para acoplar una jeringa (3 mL de capacidad) en una de las bocas de la llave con la finalidad de lograr atenuar la fuerza de la pulsación en la jeringa, la cual se mantuvo cerrada gracias al vacío generado en la misma (Fig. 2).

Figura 2. Esquema del sistema de flujo continuo



EC = equipo computarizado, Det = detector, C = celda de flujo, D = desecho, V = válvula, J = jeringas, BP = bomba peristáltica, M = muestra y SC = solvente cargador.

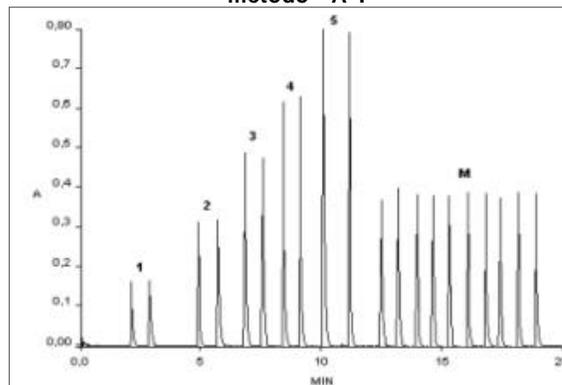
Procedimiento analítico

Con la finalidad de verificar la eficiencia de la extracción directa de AZ en metanol versus otros métodos de extracción más rigurosos, se comparó el % de AZ disuelto a partir de las tabletas pulverizadas y el % de AZ extraído a partir de las tabletas pulverizadas con cloroformo. Espectrofotometría UV convencional fue usada para el análisis cuantitativo.

El solvente seleccionado como transportador se bombeó continuamente hasta obtener una línea base uniforme a 277 nm. Las disoluciones de prueba se inyectaron periódicamente (30 a 45 segundos) y se registraron las correspondientes señales del analito. Para determinar la concentración de AZ en tabletas se utilizó la curva de calibración convencional (método A) obtenida por inyecciones duplicadas (Fig. 3) y por el método de adición estándar (método B), obtenida por inyecciones quintuples (Fig. 4). La precisión del

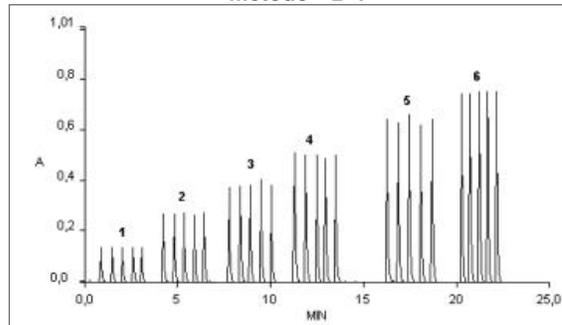
método analítico se determinó inyectando, por separado, dos de las soluciones patrones, para cada método, durante un periodo continuo de 25 minutos, en cada caso.

Figura 3. Registro del análisis por flujo continuo, método "A".



Los 5 conjuntos de picos de la izquierda corresponden a inyecciones por duplicado de patrones de 25, 50, 75, 100 y 125 µg/mL de AZ. Los conjuntos de picos restantes corresponden a inyecciones repetidas de una misma muestra.

Figura 3. Registro del análisis por flujo continuo, método "B".



Los 6 conjuntos de picos corresponden a inyecciones por quintuplicado de patrones de 0, 20, 40, 60, 80 y 100 mg/mL de AZ más una concentración fija de la muestra equivalente a 20 µg/mL.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo inicial de este trabajo fue aplicar un método por inyección en flujo, previamente desarrollado por los autores [León et al, 2001], a la determinación de AZ en tabletas. Para adaptar el referido método, sin embargo, fue necesario llevar a cabo algunos experimentos preliminares que ameritaron la modificación de una variable a la vez, manteniendo constante las demás. Una disolución de ácido clorhídrico 0,1 M resultó satisfactoria como corriente portadora del analito. Se eligió esta disolución gracias a la solubilidad que presenta el AZ en medio ácido. Las inyecciones se efectuaron rápidamente como un bolo de líquido sin alterar el flujo de la corriente

portadora. El volumen de muestra inyectado óptimo se obtuvo utilizando un microtubo, en forma de espiral, de 75 cm de largo, equivalente a un volumen de 500 µL. La reducción del efecto de las pulsaciones se logró utilizando cuatro rodillos para la fase móvil y dos rodillos para la toma de muestra. El caudal de flujo óptimo se alcanzó a 8 mL/min/rodillo. El uso de dos jeringas en línea permitió disminuir notoriamente el efecto de las pulsaciones sobre la señal de respuesta.

La precisión entre rachas de los métodos "A" y "B" fue de no más de 2%. No obstante, el coeficiente de variación dentro de rachas, para ambos métodos fue menor o igual a 1,5% (tabla 1), el cual puede considerarse aceptable en comparación con otros reportados para este tipo de análisis.

Tabla 1. Parámetros analíticos

Parámetro	Método A	Método B
Ecuación de regresión ^a (a):	0,0002452	0,0094000
Ecuación de regresión ^a (b):	0,0004455	0,0004568
Coefficiente de correlación:	0,9999	0,9992
Desviación estándar:	0,0002	0,0006
Límite de detección (µg/mL):	0,0011	0,011
Intervalo lineal (µg/mL):	25 -100	20 -100
Precisión: n	25	25
media	0,0246	0,0272
CV	1,4%	1,5%

^a $Y = a + bX$; $Y = \text{área}$ $X = \mu\text{g/mL}$

Para el método "A", se obtuvo una ecuación de regresión con una intersección insignificante y un coeficiente de correlación superior a 0,999 los cuales avalaron la obtención de una línea recta para estimar la concentración de AZ por interpolación de la curva. El uso de la ecuación de regresión condujo a un límite de detección tan bajo como 0,001 µg/mL (tabla 1). La razón entre las cifras de la recta de regresión para el intervalo lineal proporcionó la concentración de AZ en la muestra problema. El contenido promedio de AZ por tableta, analizado en 3 productos del mismo lote, se encontró dentro de los límites establecidos por la USP XXIV (tabla 2).

Para el método "B", también se consiguió una ecuación de regresión con una intersección insignificante y un coeficiente de correlación superior a 0,999 que garantizaron la obtención de una línea recta para estimar la concentración de AZ por extrapolación de la curva. El uso de la ecuación de regresión condujo a un límite de detección mayor que para el método "A", no obstante, puede considerarse bajo (tabla 1). La razón entre las cifras de la recta de regresión para el intervalo lineal proporcionó la concentración de AZ en la muestra problema. El contenido promedio de AZ

por tableta, analizado en 3 productos del mismo lote, se encontró dentro de los límites establecidos por la USP XXIV (tabla 2).

El análisis estadístico de los resultados mediante la prueba de Mann-Whitney, muestra que no existe una diferencia significativa ($\alpha = 0,05$) entre las poblaciones de las dos muestras (métodos). Por lo tanto, no existe evidencia de que los dos métodos originen resultados significativamente diferentes (tabla 2).

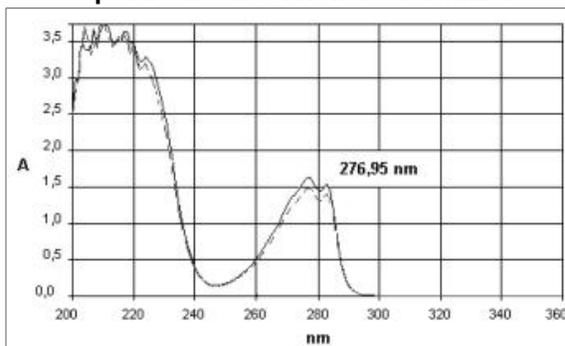
Tabla 2. Resultados y comparación estadística de los métodos

Parámetros	Método	
	A	B
Contenido de astemizol teórico (mg/tab)	10 ($\pm 10\%$) ^a	
Contenido de astemizol práctico (mg/tab)	9,73	9,82
% Recuperado	97,3	98,2
Nº de ensayos ^b	3 ^c	3
CV dentro de rachas	1,4%	-
CV entre rachas	2%	1,7%
Prueba Man-Whitney ^d	Método A = Método B	
Valor de p esperado	0,5508	
Valor de p obtenido	0,5541	
Resultado	No se puede rechazar $\alpha = 0,05$	

^a USP XXIV ^b 3 productos del mismo lote ^c 10 réplicas en cada caso ^d Las dos muestras proceden de la misma población.

En este estudio, se eligió el método de adición estándar gracias a las ventajas que este ofrece desde el punto de vista de posibles interferencias que representan los excipientes. No se aplicó extracción previa del analito ya que no se observó una diferencia significativa entre la disolución directa del analito en metanol y la extracción previa con cloroformo. En todos los casos la diferencia fue menor que 1% ($n = 3$). El espectro de una solución patrón se comparó con el espectro de una solución muestra de tabletas, usando espectrofotometría UV convencional, no observándose diferencia espectral entre uno y otro. Este resultado fue uno de los indicativos de la ausencia de interferencias por parte de los excipientes (Fig. 5). Por otra parte, es posible inferir que éstos no deberían interferir a la longitud de onda analítica, dado que las características químicas de los excipientes así lo indican: lactosa, almidón de maíz, celulosa microcristalina, almidón pregelatinizado, povidona K90, estearato de magnesio, dióxido de silicio coloidal y lauril sulfato de sodio [<http://www.rxlist.com>].

Figura 5. Representación gráfica del espectro de absorción de astemizol



(—) Solución de AZ patrón de 45 µg/mL. (- - -) Solución muestra de AZ en tabletas equivalente a 45 µg/mL.

A diferencia del método descrito por Alwarthan y Al-Obaid (1996), quienes determinaron colorimétricamente AZ usando inyección en flujo continuo, el método desarrollado en este estudio no ameritó extracción laboriosa y tampoco transformación previa del analito. Siendo el AZ soluble en metanol, fue posible extraerlo directamente de la matriz, transformarlo en el respectivo clorhidrato y luego inyectarlo en la corriente portadora constituida por ácido clorhídrico diluido.

Analizando la velocidad de flujo y el caudal de la corriente portadora del método propuesto, puede inferirse que éstos representan una desventaja, no obstante, se debe considerar que la composición del solvente transportador es simple y económico.

Se propone el método de adición estándar por inyección en flujo continuo como una alternativa de análisis de AZ en tabletas. El método planteado constituye un sistema semiautomático sencillo y económico, que permite llevar a cabo un elevado número de análisis de rutina. Siendo esta la ventaja primordial, debe señalarse que este método facilita el control continuo de la composición del producto farmacéutico (materia prima, producto semiterminado y producto final) mientras se va manufacturando y la evaluación de la biodisponibilidad *in vitro*. Los laboratorios que diariamente realizan un elevado número de análisis de rutina podrían lograr la total automatización incorporando un sistema robotizado que controle la toma de muestra periódicamente.

A pesar de que no se analizaron muestras de AZ en suspensión, no se descarta la aplicación de ambos métodos, después de una apropiada extracción del analito.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelmageed, O. H. (1996). **Analytical study of some Antihistaminics with haematoxylin reagent.** Bull. Pharm. Sci. Assiut University. Vol. 19: 53-62.

Al-Obaid, A. M. y Mian, S. M. (1991). **Analytical profile of astemizole.** Analytical profile of drug substances. Academic Press, Inc. U.S.A. Vol. 20. P. 173-208.

Alwarthan, A. A. y Al-Obaid, A. M. (1996). **Colorimetric determination of astemizole in bulk and its pharmaceutical dosage forms using flow injection.** J. Pharm. Biomed. Anal. Vol. 14 (5): 579-582.

Daabees, H. G. (1999). **A new sensitive spectrophotometric method for the analysis of some antihistamines.** Spectrosc. Lett. Vol. 32(6): 913-930.

El Walily, A. M., El Gindy, A. y Wahbi, A. M. (1995). **Determination of astemizole using iodine charge-transfer complexation and high-performance liquid chromatography.** S.T.P. Pharma Prat. 5(5): 403-408.

Kelani, K., Bebawy, L. I. y Abdel-Fattah, L. (1999). **Determination of astemizole, terfenadine and flunarizine hydrochloride by ternary complex formation with eosin and lead (II).** J. Pharm. Biomed. Anal. Vol. 18: 985-992.

León, L. A., Ovalles, D. J. F., Buchheister, M. M., Calderon, L., y Luna, J. R. (2001). **Determinación de amidarona por inyección en flujo.** (Resultados aún sin publicar).

Qureshi, S. Z. y Khan, M. A. (1996). **Spectrophotometric determination of astemizole by charge-transfer complex formation with chloranilic acid.** Analisis. Vol. 24(5): 190-192.

Sadana, G. S. y Potdar, A. J. (1989). **Determination of astemizole in Pharmaceutical dosage forms by high-performance liquid chromatography.** Indian drugs. Vol. 27(2): 140-142 en: Al-Obaid, A. M. y Mian, S. M. 1991. **Analytical profile of astemizole.** Analytical profile of drug substances. Academic Press, Inc. U.S.A. Vol. 20. P. 173-208.

Sastry, C. S. P. y Naidu, P. Y. (1997). **Spectrophotometric determination of astemizole in pure and pharmaceutical formulations.** Indian drugs. Vol. 34(3): 140-142.

Sastry, C. S. P. y Naidu, P. Y. (1998). **Spectrophotometric determination of astemizole.** Talanta. Vol. 45: 795-799.

Spilva de L., A. y Muktans, S. Y. (2001). **Guía Spilva de las especialidades farmacéuticas.** Global Ediciones, S.A. Caracas. Venezuela. P. 601.

Suryanarayana, M. V., Venkataraman, M., Satyanarayana R., M. y Parthasaradhi R., B. (1993). **Evaluation of astemizole purity by HPLC.** Talanta. Vol. 9: 1357-1360.

USP, XXIV (2000). **United States Pharmacopoeia.** USPC, Inc. U.S.A. P. 173-174

<http://www.rxlist.com> (julio, 2001)