

DETERMINACIÓN DE DEXAMETASONA EN INYECTABLES DE USO VETERINARIO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA

Jaime H. Rojas*¹, **Rosalba Guevara****, **John Mario Cadavid*** y **Milena Mendoza***

* Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, AA 14490, Santafé de Bogotá, Colombia,

** Instituto Colombiano Agropecuario ICA. ¹ E-mail: jairoja@ciencias.ciencias.unal.edu.co

RESUMEN

Se presentan en este artículo los resultados obtenidos durante el desarrollo de un método de análisis para la determinación de dexametasona en inyectables de uso veterinario así como los resultados de la validación del mismo. El método consiste en una separación cromatográfica en fase inversa empleando como fase móvil una mezcla de agua - acetonitrilo (65 : 35), una columna C₁₈ y detección espectrofotométrica a 238 nm. El método validado se aplicó para la determinación de dexametasona en un producto del mercado.

Palabras Clave: Dexametasona - Cromatografía líquida - C₁₈ - Detección ultravioleta - Desarrollo - Validación.

SUMMARY

DETERMINATION OF DEXAMETASONE IN VETERINARY INJECTIONS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

A reverse high performance liquid chromatography method was developed for the quantitative assay of dexametasona, a glucocorticoide uses as antinflamatory agent. The method was validated and then applied to the assay of dexametasona. A C₁₈ column was used and the detection was performed at 238 nm. A mixture of water and acetonitrile (65 : 35) was used as the mobile phase. The validated method was applied to the determination of dexametasona in one marked product.

Key Words: Dexametasona - High performance liquid chromatography - C₁₈ - UV detection - Development - Validation.

INTRODUCCIÓN

La dexametasona se emplea en veterinaria principalmente por sus propiedades antinflamatorias y antialérgicas en especies domésticas y la cetosis bovina (1-4). La dexametasona ha sido determinada por espectrofotometría (5) al igual que por cromatografía líquida de alta eficiencia (6-10). En el presente trabajo se presentan los

resultados obtenidos en el desarrollo y validación de un método de análisis para dexametasona por HPLC en fase inversa, empleando una columna de octadecilsilano y detección por espectrofotometría ultravioleta a 238 nm (5).

PARTE EXPERIMENTAL

Equipos

Cromatógrafo líquido Waters 510, Integrador Perkin Elmer LCI 100, Detector UV Waters Ass. 484, Inyector Ass U6K, Columna microBondapack 300 x 3.9 mmID, 5 μm, Microjeringa Hamilton de 50 μL, Equipo de filtración Milipore.

Reactivos

Dexametasona USP, MeOH HPLC Baker, acetonitrilo HPLC Baker, agua HPLC. Otros reactivos RA empleados fueron : cloroformo, metanol, etanol, ácido acético glacial, propilparabeno, metilparabeno, alcohol bencílico, HCl, NaOH.

Optimización del Sistema Cromatográfico

Durante el proceso de selección de la fase móvil se preparó una solución concentrada de dexametasona en etanol y por dilución de ésta con agua una solución de concentración 20 mcg/mL. Como volumen de inyección se trabajó siempre con 20 μL y detección UV a 238 nm. Las fases móviles estudiadas así como los flujos empleados de cada una se reportan en la Tabla 1. El valor de atenuación del integrador se fijó en 128.

Estudios de estabilidad

Muestras de dexametasona se sometieron a reflujo durante 2 y 10 horas con HCl 1N y con NaOH 1N, luego de lo cual los hidrolizados se emplearon para los estudios de selectividad por HPLC previa neutralización y para aislar los productos de descomposición por cromatografía preparativa en capa delgada. En este último caso las

Tabla 1. Fases móviles estudiadas para la determinación de dexametasona por cromatografía en fase inversa.

| No | Fase Móvil | Composición | Flujo mL/min |
|----|-----------------------------------|-------------|--------------|
| 1 | Agua: Acetonitrilo | 75 : 25 | 2 |
| 2 | | 70 : 30 | 2 |
| 3 | | 65 : 35 | 2, 1.5 |
| 4 | | 60 : 40 | 2 |
| 5 | | 55 : 45 | 1.5, 0.8 |
| 6 | Agua: Metanol | 45 : 55 | 2 |
| 7 | | 40 : 60 | 2, 1.5 |
| 8 | | 35 : 65 | 2, 1.5, 1 |
| 9 | | 30 : 70 | 2 |
| 10 | Ácido fosfórico: Acetonitrilo | 70 : 30 | 2 |
| 11 | | 60 : 40 | 2 |
| 12 | Fosfato de potasio 0.01M: Metanol | 48 : 52 | 2 |

fases móviles más adecuadas fueron cloroformo : metanol : agua (93.5:6:0.5) para los extractos provenientes de la hidrólisis ácida y cloroformo : ácido acético glacial (9:1) para los extractos alcalinos. En estos estudios se empleó sílica gel 60 F-254 como soporte.

Igualmente se estudió la estabilidad de los productos frente a la luz en envase ámbar y en envase translúcido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las diferentes fases móviles que contenían metanol como modificador orgánico ofrecieron separación adecuada entre y con los excipientes que absorben a 238 nm para cada uno de los dos productos, a excepción de aquella que contenía un 70 % de metanol. Las fases móviles constituidas por acetonitrilo y ácido fosfórico presentaron baja resolución mientras que la de fosfato monopotásico -metanol un tiempo de retención demasiado alto. Los ensayos realizados con mezclas de agua - acetonitrilo fueron bastante diferentes siendo la proporción 65 : 35 la más adecuada, con ventajas adicionales sobre las conformadas por metanol desde el punto de vista de tiempos de retención y de resolución (Figura 1). El flujo óptimo se estableció en 1.5 mL/min.

Los tiempos de retención para la dexametasona con las fases móviles 1 y 2 fueron demasiado altos, mientras que con la 4 y la 5 no se presentó separación entre los excipientes y la dexametasona.

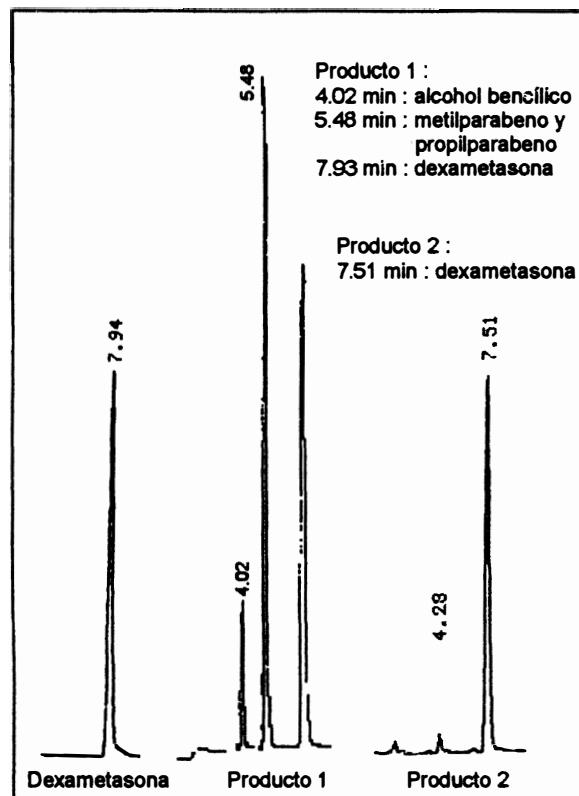


Figura 1. Cromatograma de excipientes adicionados de dexametasona.

El Producto 1 estaba conformado por PEG 400, alcohol bencílico, metilparabeno, propilparabeno y etanol, mientras que el Producto 2 por propilenglicol, monoetanolamina e isopropanol. Esta fase móvil presentó resultados igualmente satisfactorios para la separación de los productos de descomposición obtenidos en los estudios de estabilidad del fármaco.

Validación de la metodología analítica

Selectividad. La selectividad del método con la fase móvil óptima se analizó además frente a los productos de descomposición obtenidos por hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina y exposición a la luz.

Tal como se observa en la Figura 2, no se presentan interferencias de los productos de descomposición de dexametasona obtenidos por hidrólisis básica ni con los obtenidos por hidrólisis ácida (Figura 3).

Resultados similares se obtuvieron con los ensayos de fotólisis realizados sobre el Producto 1 (Figura 4). En el caso del Producto 2 la descomposición fue completa, observándose varias señales cromatográficas más no la correspondiente a la dexametasona.

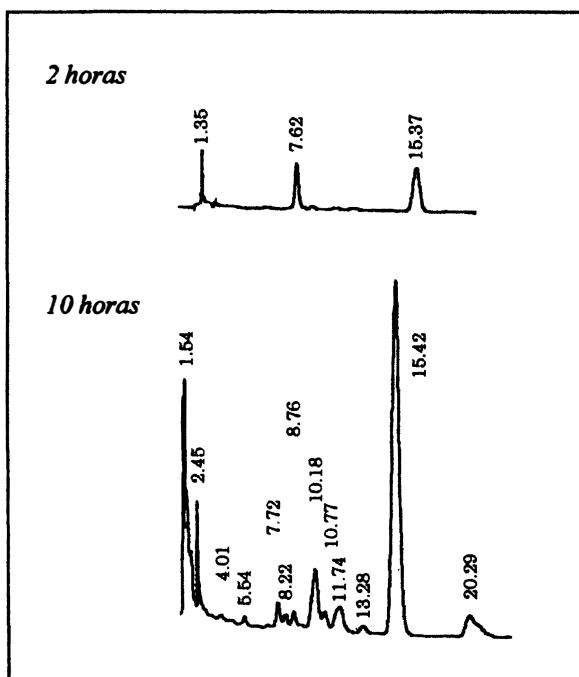


Figura 2. Cromatogramas obtenidos por hidrólisis básica de la dexametasona (tr : 7.72 min)

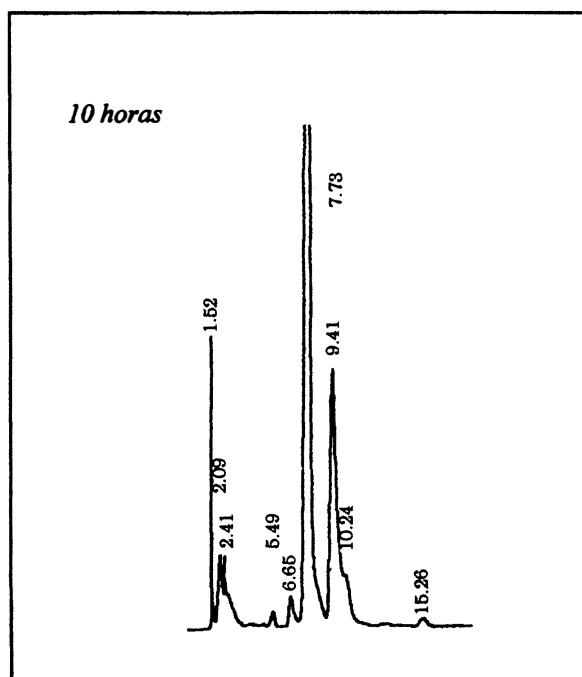


Figura 3. Cromatogramas obtenidos por hidrólisis ácida de la dexametasona (tr : 7.73 min)

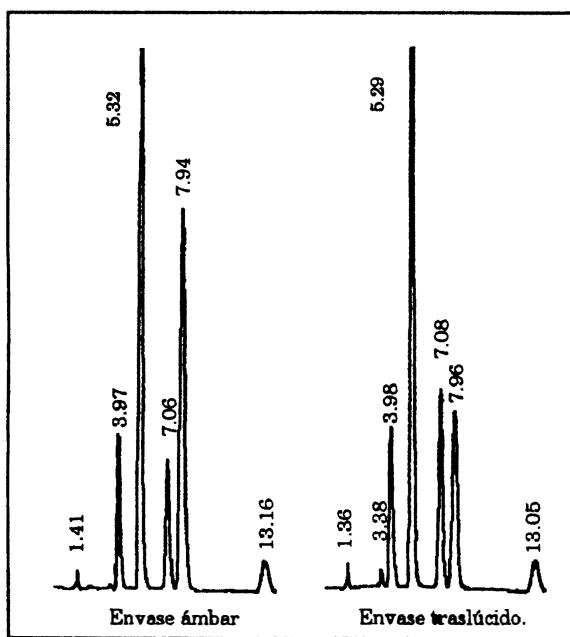


Figura 4. Ensayo de fotolisis del Producto 1

Linealidad. La proporcionalidad en la respuesta tanto del sistema como del método se verificó con concentraciones de dexametasona entre 10 y 50 mcg/mL. Con concentraciones superiores, hasta 100 mcg/mL se

observó desvío de la linealidad. De cada concentración preparada por duplicado se realizó doble inyección. Las curvas de calibración (sistema y método, Producto 1) ajustadas por mínimos cuadrados se representan en la Figuras 5 y 6. Los valores de la ordenada en ambas gráficas corresponden a los valores experimentales de área divididos por 1000.

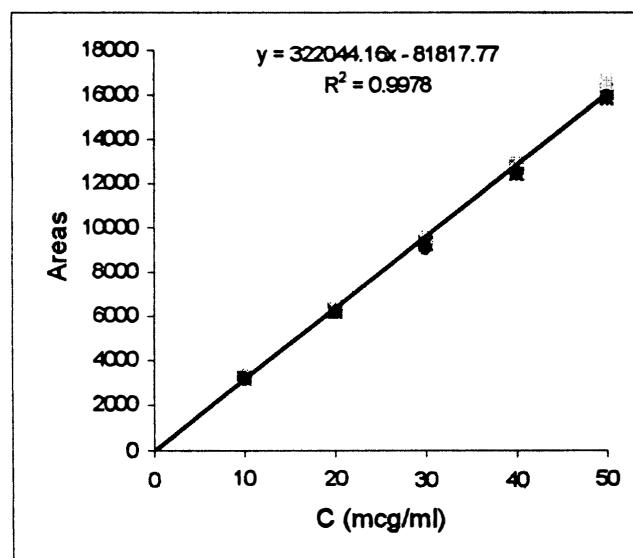


Figura 5. Curva de calibración para el sistema.

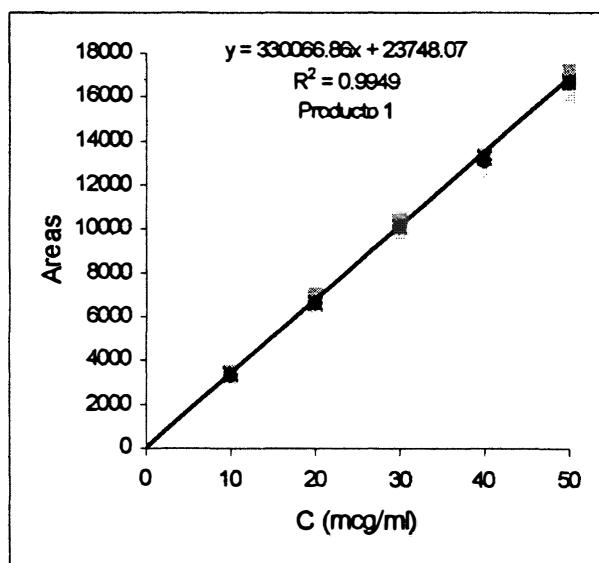


Figura 6. Curva de calibración para el método

En la Tabla 2 se reportan los límites calculados de acuerdo al error estandar para el intercepto y para la pendiente en el estudio de linealidad del sistema y en el estudio de linealidad del método en el caso del Producto 1. Los valores experimentales de *t* indican convergencia al origen y un valor de pendiente significativamente diferente de cero.

Tabla 2. Valores de interceptos y pendientes para linealidad del sistema y del método*

| | Parámetro | L. Inferior | L. Superior | <i>t</i> exp |
|----|------------|-------------|-------------|--------------|
| S | Intercepto | -505716.90 | 3420.8172 | -0.417 |
| | Pendiente | 313006.59 | 331081.72 | 76.97 |
| M1 | Intercepto | -640385.85 | 687881.96 | 0.077 |
| | Pendiente | 315907.48 | 344226.24 | 50.35 |
| M2 | Intercepto | -148920.72 | 889859.98 | 1.541 |
| | Pendiente | 253084.13 | 275231.01 | 51.53 |

*S : sistema, M 1 : método Producto 1, M 2 : método Producto 2,
t cal (28, 0.05) : 2.048

Los valores de *F* experimentales en los ensayos de linealidad del método tanto para cada uno de los dos productos indican una regresión altamente significativa (Tabla 3).

Precisión y Exactitud. La precisión para el sistema y para el método en el Producto 1 se determinó mediante 6 análisis independientes de dos soluciones diferentes. Los valores del coeficiente de variación obtenidos se situaron entre 0.65 y 2.19%.

El estudio de la exactitud del método se realizó a tres niveles de concentración y 4 determinaciones independientes para cada nivel. Los resultados (Tabla 4) conducen a un porcentaje de recuperación promedio de 99.83% y un *t* calculado de 1.045, inferior al valor de la tabla (2.201) para una probabilidad α de 0.05, indicando que el método es exacto.

Límites de Cuantificación. El límite de cuantificación se estableció mediante el método de curva de calibración a bajas concentraciones. Los niveles de concentración se situaron entre 0.75 y 4 mcg/mL y el límite de cuantificación calculado fue de 0.2 mcg/mL.

Sólitez. La sólitez del método se estableció de acuerdo al diseño de Placket Burtman y realizando pequeñas variaciones en algunos parámetros del método (Tabla 5). Para dos variables se encontró que la diferencia observada para cada nivel (superior e inferior) fue menor a la diferencia del producto de la desviación estandar de la precisión del método por la raíz cuadrada de 2 concluyéndose que el método es sólido frente a las variaciones realizadas, composición de la fase móvil y cambio de analista. El método no resiste cambios en las otras tres variables.

El método validado se aplicó satisfactoriamente a la determinación de dexametasona en muestras del Producto 1 tomadas del mercado, sobre muestras de retención (ICA) y sobre muestras de retención del laboratorio fabricante, con diferentes fechas de vencimiento. Los porcentajes de dexametosana hallados oscilaron entre 89.62 y 99.36% de la cantidad etiquetada, 2 mg/mL.

Tabla 3. Anova de la regresión para linealidad del método*

| Fuente | GI | SC | | CM | | Fexp | |
|-----------|----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---------|---------|
| | | M1 | M2 | M1 | M2 | M1 | M2 |
| Regresión | 1 | 6.5366×10^{14} | 4.1868×10^{14} | 6.5366×10^{14} | 4.1868×10^{14} | 5488.78 | 7350.31 |
| Error | 28 | 3.3518×10^{12} | 2.0499×10^{12} | 1.1971×10^{11} | 7.3214×10^{10} | | |
| Total | 29 | 6.5702×10^{14} | 4.2073×10^{14} | | | | |

*M1: método producto 1, M2 : método producto 2, *F* tab (1/28, 0.05) : 4.20

Tabla 4. Resultados del ensayo de exactitud para el Producto 1.

| C (mcg/mL) | Área | % Teórico | % Encontrado | % Recuperado |
|---------------|-----------|--------------|-----------------|-----------------|
| 23.87 | 7903710 | 80 | 79.9989 | 100.00 |
| 23.87 | 7895672 | 80 | 79.9170 | 99.90 |
| 23.87 | 7974682 | 80 | 80.7220 | 100.90 |
| 23.87 | 7894321 | 80 | 79.9033 | 99.88 |
| 29.84 | 9847772 | 100 | 99.7962 | 99.80 |
| 29.84 | 9867482 | 100 | 99.9970 | 100.00 |
| 29.84 | 9870163 | 100 | 100.0243 | 100.02 |
| 29.84 | 9856432 | 100 | 99.8845 | 99.88 |
| 35.80 | 11827433 | 120 | 119.9897 | 99.90 |
| 35.80 | 11643879 | 120 | 118.1184 | 98.43 |
| 35.80 | 11758637 | 120 | 119.2887 | 99.41 |
| 35.80 | 118016332 | 120 | 119.7268 | 99.77 |

Tabla 5. Influencia de la variación de algunos parámetros en la respuesta

| Variable | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | Diferencia* |
|---------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------------|
| Flujo mL/min | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.4 | 1.4 | 1.4 | 364919.16 |
| Temperatura, °C | 30 | 20 | 20 | 30 | 30 | 20 | 153974.5 |
| Long. columna, cm | 30 | 15 | 15 | 30 | 15 | 30 | 234935.52 |
| Acetonitrilo : Agua | 36 : 64 | 34 : 66 | 36 : 64 | 34 : 66 | 34 : 66 | 36 : 64 | 48100.90 |
| Analista | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 14655.09 |
| Área obtenida | 13137048 | 12978237 | 13004471 | 13429025 | 13332023 | 13453465 | |

* Media límite superior - media límite inferior, desviación estandar del método $\times 1.4142 = 135152.8$

Conclusiones

Un método de análisis por HPLC en fase inversa para la determinación de dexametasona en inyectables de uso veterinario fue estandarizado. Durante la etapa de validación, el método demostró ser preciso, exacto, lineal, reproducible y selectivo frente a los auxiliares de formulación de los dos productos inyectables así como frente a los productos de descomposición obtenidos por hidrólisis ácida, hidrólisis básica y por exposición a la luz. Esta última característica, junto con el bajo límite de cuantificación obtenido, permiten que el método pueda aplicarse en estudios de estabilidad del fármaco y adecuarse para su determinación en fluidos biológicos. Igualmente el método podría emplearse en ensayos de pureza cromatográfica de la materia prima. En un próximo artículo se expondrán los resultados obtenidos con la dexametasona fosfato de sodio.

La formulación del Producto 2 resultó altamente inestable por lo cual el estudio para este producto no se realizó completamente.

Agradecimientos

Se agradece al Instituto Colombiano Agropecuario ICA-LANIP por su apoyo financiero para la realización del presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Isaza, M., Isaza G.M. et al., D.C. Blood, J.A., "Fundamentos de Farmacología Terapéutica", 6^a. Ed., 1990.
2. F.O. Hernández, "Farmacología y Terapéutica Veterinaria", 2^a Ed., Interamericana, 1985.
3. H. Somano et al., "Farmacología Veterinaria", Mc Graw Hill, México, 1982, p. 536, 537, 578-580. 583-585.
4. G. Goodman et al., "Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica", 8^a Ed., Ed. Panamericana, 1991.
5. J. M. Cadavid y M.C. Mendoza, "Estandarización y Validación de Dos Técnicas Analíticas (Espectrofotometría Ultravioleta y Cromatografía Líquida de

- Alta Eficiencia) para la Determinación de Dexametasona y Dexametasona Fosfato de Sodio en Cinco Inyectables de Uso Veterinario, Tesis de Grado, Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, 1997.
6. V. Das Gupta, *J. Pharm. Sci.*, **68**, 926 (1979).
 7. A.M. De Paolis, et al., *J. of AOAC*, **60**, 210 (1977).
 8. E. Isuel y J.J. Ashley, *J. Chrom. Bio. Appl.*, **145**, 213 (1978).
 9. L.C.K. Loo, et al., *J. Chrom. Bio. Appl.*, **143**, 314 (1977).
 10. A. Shalaby, *J. Liq. Chrom.*, **14**, 1297 (1991).