

Acetilcisteína granulado para solución oral: estudio del efecto estabilizador con EDTA en la cuantificación del activo por HPLC

M. Verón Moros¹, A. Zamanillo Sainz², L. Coll Cuota³, L. Ferreiros Carrillo⁴, S. González Rollán⁵, JM. Villarta Nuñez-Cortes⁶

Med Mil (Esp) 2005; 61 (3): 274-276

RESUMEN

Antecedentes y Objetivos: Para la cuantificación de acetilcisteína, en el elaborado Acetilcisteína DEF, se desarrolla un nuevo método analítico por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Una de las variables que a priori se observó en la validación como crítica, fue la estabilización de la muestra a cromatografiar. Con este objetivo se prepararon disoluciones con diferentes porcentajes de ácido etileno diamino tetra acético (EDTA) para comprobar la estabilización la solución y cual es el porcentaje más idóneo. **Materiales y Método:** Se estudian un total de 120 disoluciones, con los porcentajes de EDTA de 0, 0.5, 1 y 1.5%, y a los diferentes tiempos de 0, 24 y 48 horas. Las muestras se analizan por HPLC. De los porcentajes cuantificados del activo se realiza el análisis de variancia con la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples con el programa estadístico SPSS 11.0. **Resultados:** Existe una degradación, a las 24 horas, en la solución de acetilcisteína sin EDTA entre un 9,6 % a un 14,2%, aumentando este porcentaje hasta el intervalo de 22,6% a 29,9 % a las 48 horas. La cantidad de EDTA (0,5%, 1% y 1,5%) adicionado a las soluciones de acetilcisteína no afecta significativamente a la concentración de acetilcisteína. **Conclusiones:** Se produce una estabilización en las soluciones que contienen EDTA, independientemente del porcentaje, determinándose implantar la menor concentración de EDTA (0,5%) en el procedimiento de valoración de acetilcisteína en el granulado para solución oral.

PALABRAS CLAVE: Acetilcisteína. EDTA. Validación. Estabilidad.

INTRODUCCIÓN

Acetilcisteína está indicada como tratamiento coadyuvante en los procesos respiratorios que cursan con hipersecreción mucosa excesiva o espesa tales como bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfisema, complicaciones pulmonares de la fibrosis y otras patologías relacionadas. La acetilcisteína se caracteriza por su acción fluidificante sobre las secreciones mucosas y mucopurulentas en los procesos respiratorios que cursan con hipersecreción y mucoestasis.

El estrés oxidativo está implicado en la patogénesis y progresión de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Los cambios estructurales del pulmón son causados por este estrés, pudiendo además acelerar el riesgo de infecciones y exarcebaciones, disminuyendo la función pulmonar. Por su carácter reductor y como precursor en la síntesis de glutatión¹, la acetilcisteína ejerce una actividad citoprotectora en el aparato respiratorio frente a la acción lesiva del estrés oxidativo^{2,3} mejorando la función pulmonar y disminuyendo el riesgo de rehospitalizaciones en estos enfermos⁴.

En el nuevo petitorio de Farmacia Militar⁵ se contempla el elaborado Acetilcisteína DEF se presenta como un granulado para solución oral en envases de 30 sobres de 1 gramo, conteniendo 200 mg de acetilcisteína y como excipientes aspartamo, aroma de naranja, colorante naranja, sílice coloidal anhidra y sorbitol.

Las Farmacopeas son códigos oficiales que recogen los criterios de calidad de las materias primas que entran a formar parte de las especialidades farmacéuticas y de estas como productos finales de consumo. Las Farmacopeas se van adaptando a las situaciones actuales de conocimiento y las posibilidades de instrumentación analítica permitiendo el uso mayoritario de métodos cromatográficos, frente a otros métodos físico-químicos menos selectivos, destacándose en los estudios de estabilidad donde se ponen de manifiesto cuali- y cuantitativamente productos de degradación.

Para el elaborado Acetilcisteína DEF, las Farmacopeas generalmente utilizadas, no describen ningún ensayo para la cuantificación del activo en el producto terminado, desarrollándose un nuevo método analítico que garantizara un mejor control de calidad. La Real Farmacopea Española recoge en la monografía del activo⁶, un ensayo para la determinación de sustancias relacionadas mediante cromatografía de líquidos y para la valoración de la riqueza se describe un ensayo por yodometría. Se determina un nuevo método para la cuantificación de acetilcisteína en el producto terminado por cromatografía de líquidos basándonos en las condiciones descritas en la monografía para el ensayo de sustancias relacionadas.

Durante la validación del nuevo método analítico propuesto, se ha observado que la solución de la muestra a cromatografiar no es estable a lo largo de la secuencia programada, produciéndose una disminución del área del pico de acetilcisteína y por lo tanto de su concentración y la aparición de un pico de degradación que aumenta con el tiempo (fig. 1).

¹ Farmacéutica civil. Titulada Superior de Investigación y Laboratorio.

² Cte. Farmacéutico.

³ Técnico de Investigación y Laboratorio.

⁴ Oficial de Investigación y Laboratorio.

⁵ Cap. Farmacéutica.

⁶ Teol. Farmacéutico.

Centro Militar de Farmacia de la Defensa (CEMIFARDEF).

Dirección para correspondencia: Mercedes Verón Moros. Centro Militar de Farmacia de la Defensa. C/ Embajadores 75. Madrid 28012. Teléfono 91 5 27 40 48.

Recibido: 8 de abril de 2005

Aceptado: 8 de agosto de 2005

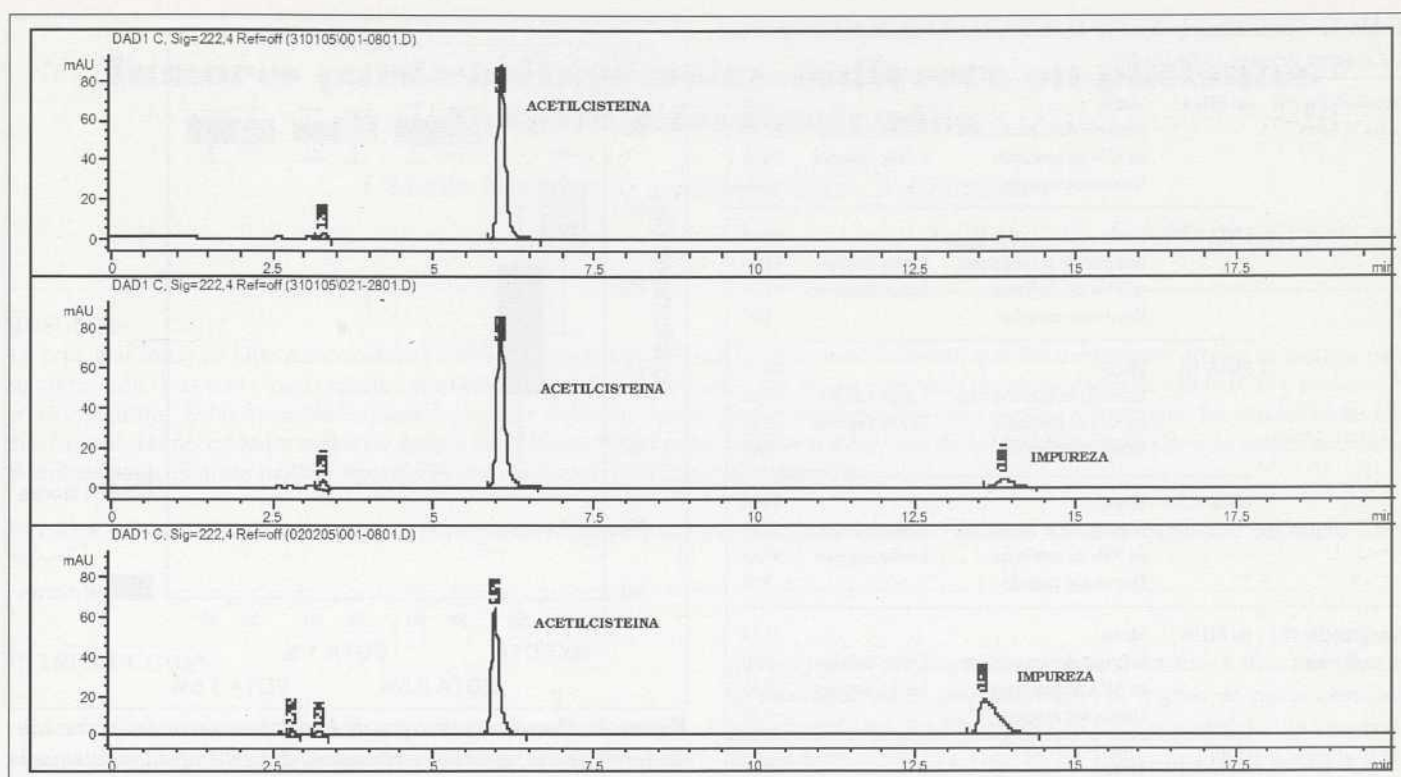


Figura 1: Cromatogramas de degradación de Acetilcisteína.

Conocido el posible efecto estabilizante del edetato sódico (EDTA) en soluciones de acetilcisteína oftálmicas⁷, se estudia el efecto de distintas concentraciones de EDTA en las disoluciones a cromatografiar con el objeto de comprobar el efecto conservante EDTA en la estabilidad de la solución y estudiar las posibilidades de introducir este estabilizante en el método analítico para la valoración del activo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudian un total de 120 disoluciones con una concentración de 0,2 mg/ml de Acetilcisteína en agua ultra pura. De estas, 30 tienen como estabilizante 0,5% de edetato sódico (EDTA), otras 30 tienen un 1% de EDTA, 30 más contienen un 1,5% de EDTA y las 30 últimas de «control» sin EDTA.

Se filtran estas disoluciones con un filtro de 0,45 μ m nylon a vial topacio, se encapsulan y se analizan por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), mediante el Cromatógrafo líquido Agilent (Mod. 1100), según método descrito en Real Farmacopea Española (6) para sustancias relacionadas, modificando la preparación de las disoluciones, pero manteniendo las condiciones cromatográficas.

Se programa una secuencia para obtener cromatogramas de las soluciones a tiempo inicial, a las 24 horas y a las 48 horas.

Los cromatogramas obtenidos se integran a través de la ChemStation (Agilent Technologies Rev. A.08.03 July 2000) y se procesan para obtener los datos de cuantificación de acetilcisteína.

Se realiza una descripción de datos cuantitativos del porcentaje de acetilcisteína con distintas concentraciones de estabilizante a los tiempos 0, 24 y 48 horas, utilizando como control la acetilcisteína sin EDTA. Se representan los diagramas de cajas de la distribución de la variable concentración de acetilcisteína a distintas concentraciones de EDTA. Se realiza el análisis de variancia de las soluciones con estabilizante y la co-

rrección de Bonferroni para comparaciones múltiples incluyendo el grupo control sin estabilizante con el programa estadístico SPSS 11.0

RESULTADOS

Para estudiar el efecto estabilizante del EDTA, los resultados del porcentaje de acetilcisteína a las 24 horas y 48 horas están expresados, considerando que a tiempo 0 la concentración inicial de acetilcisteína es del 100% en todas las muestras analizadas.

En la tabla 1 se observa que existe a las 24 horas una degradación en la solución de acetilcisteína sin ningún tipo de estabilizante entre 9,6 % a un 14,2% para un intervalo de confianza del 95%, aumentando este porcentaje hasta el intervalo de 22,6% a 29,9% a las 48 horas. Las tres soluciones que contienen EDTA mantienen la concentración de acetilcisteína superior al 98% en los dos tiempos del estudio, no mostrando diferencias apreciables entre las 24 horas y 48 horas (fig. 2), siendo las diferencias significativas ($p < 0,05$) de estas tres soluciones respecto al grupo control (tabla II). El análisis de variancia demuestra que la cantidad de EDTA (0,5%, 1% y 1,5%) adicionado a las soluciones de acetilcisteína no afecta significativamente ($p > 0,05$) a la concentración de acetilcisteína en las 24 o 48 horas del estudio, coincidiendo con las comparaciones múltiples en la prueba de Bonferroni, ($p > 0,05$) en las comparaciones entre las tres soluciones con EDTA (tabla 2).

DISCUSIÓN

La cromatografía líquida de alta presión es una técnica que ofrece una exactitud, precisión, sensibilidad y especificidad superior a otros métodos analíticos más tradicionales, garantizando del mejor modo la calidad tanto de las materias primas como de los productos

Tabla 1. Datos descriptivos de la recuperación de Acetilcisteína en los cuatro grupos del estudio

acetilcisteína (%) a las 24 horas	sin EDTA	Media		88,05
		Intervalo de la media para un 95% de confianza	Límite Inferior	85,75
			Límite Superior	90,35
		Desviación estándar		6,16
	EDTA 0,5%	Media		98,91
		Intervalo de la media para un 95% de confianza	Límite Inferior	98,29
			Límite Superior	99,54
		Desviación estándar		1,67
	EDTA 1%	Media		98,75
		Intervalo de la media para un 95% de confianza	Límite Inferior	98,02
			Límite Superior	99,48
		Desviación estándar		1,95
EDTA 1,5%	Media		99,20	
	Intervalo de la media para un 95% de confianza	Límite Inferior	98,57	
		Límite Superior	99,83	
	Desviación estándar		1,68	
acetilcisteína (%) a las 48 horas	sin EDTA	Media		73,74
		Intervalo de la media para un 95% de confianza	Límite Inferior	70,10
			Límite Superior	77,38
		Desviación estándar		9,76
	EDTA 0,5%	Media		98,88
		Intervalo de la media para un 95% de confianza	Límite Inferior	98,14
			Límite Superior	99,62
		Desviación estándar		1,98
	EDTA 1%	Media		98,71
		Intervalo de la media para un 95% de confianza	Límite Inferior	98,08
			Límite Superior	99,33
		Desviación estándar		1,67
EDTA 1,5%	Media		98,76	
	Intervalo de la media para un 95% de confianza	Límite Inferior	98,10	
		Límite Superior	99,42	
	Desviación estándar		1,77	

terminados elaborados bajo diversas formas farmacéuticas.

Tabla 2. Comparaciones múltiples de las concentraciones de EDTA en la recuperación de Acetilcisteína

Tiempo de almacenamiento	Comparaciones concentraciones (%) de EDTA	Diferencia de la media	Intervalo de confianza (95%) de la diferencia de la media
24 horas	(0,0 - 0,5)	-10,86 *	(- 8,47; - 13,25)
	(0,0 - 1,0)	-10,70 *	(- 8,31; - 13,09)
	(0,0 - 1,5)	-11,14 *	(- 8,76; - 13,54)
	(0,5 - 1,0)	0,16	**
	(0,5 - 1,5)	-0,29	**
	(1,0 - 1,5)	-0,45	**
48 horas	(0,0 - 0,5)	-25,13 *	(- 21,59; - 28,69)
	(0,0 - 1,0)	-24,97 *	(- 21,41; - 28,52)
	(0,0 - 1,5)	-25,01 *	(- 21,47; - 28,57)
	(0,5 - 1,0)	0,17	**
	(0,5 - 1,5)	0,12	**
	(1,0 - 1,5)	-0,05	**

* Grado de significación inferior a 0,05 (p<0,05).

** Los intervalos de confianza incluyen el valor 0.

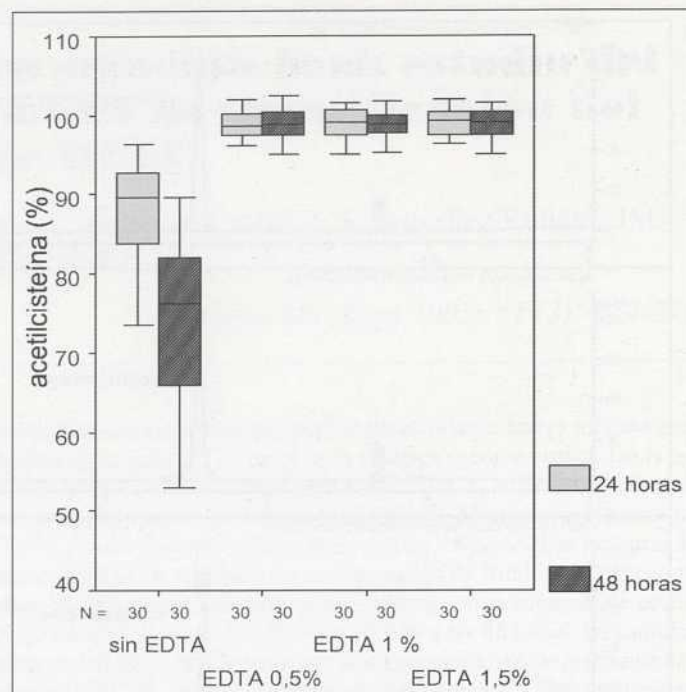


Figura 2: Diagramas de cajas de la distribución de los porcentajes de Acetilcisteína según concentraciones de EDTA y tiempo del estudio.

La necesidad de estabilizar la muestra a cromatografiar nos lleva a diseñar este estudio donde se pone claramente de manifiesto la existencia una degradación del activo en aquellas soluciones que no contienen EDTA. En aquellas que si lo contienen, se produce una estabilización de dicha degradación independientemente del porcentaje, en el periodo de tiempo estudiado. Este tiempo se estimó como el máximo en el que se desarrollaría una secuencia programada de los diferentes lotes de la especialidad Acetilcisteína DEF.

A tenor de los resultados, se comprueba por tanto el efecto conservante de EDTA en las disoluciones a cromatografiar de acetilcisteína, por lo que se opta por introducir este estabilizante en el método analítico para la valoración del activo en el producto terminado.

Al no existir diferencias significativas en los porcentajes recuperados en las tres concentraciones de EDTA propuestas, se determina implantar la menor concentración de EDTA (0,5%) en el procedimiento de valoración de acetilcisteína en el granulado para solución oral.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dekhuijzen PN. Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2004; 23(4): 629-36.
2. Guerin JC, Leophonte P, Lebas FX, Liard F, Terrioux P, Boulanger P. [Oxidative stress in bronchopulmonary disease: contribution of N-acetylcysteine (NAC)] *Rev Pneumol Clin* 2005; 61(1 Pt 1): 16-21.
3. Koksels O, Ozdulger A, Ercil M, Tamer L, Ercan B, Atik U, Cinel L, Cinel I, Kanik. Effects of N-acetylcysteine on oxidant-antioxidant balance in oleic acid-induced lung injury. *Exp Lung Res* 2004; 30(6): 431-46.
4. Gerrits CM, Herings RM, Leufkens HG, Lammers JW. N-acetylcysteine reduces the risk of re-hospitalisation among patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 21(5): 795-8.
5. Orden Ministerial núm 53/2004 de 18 de Marzo por el que se establece el petitorio de Farmacia Militar de Defensa (BOD núm 63 del 2004).
6. Real Farmacopea Española. Ministerio de Sanidad y Consumo. 2.ª Ed. 2002.
7. Anaizi NH, Swenson CF, Dentinger PJ. Stability of acetylcysteine in an extemporaneously compounded ophthalmic solution. *Am J Health Syst Pharm* 1997; 54(5): 549-53.