

Determinação Quantitativa da Dexametasona em Matéria-Prima e Comprimidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Ruy Carlos Ruver BECK

Laboratório de Controle da Qualidade, Departamento de Farmácia Industrial,
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Campus Universitário, Prédio 26, CCS,
Camobi. Santa Maria, RS, Brasil CEP 97015-900 (e-mail: ruybeck@ccs.ufsm.br)

RESUMO. Este estudo apresenta uma nova metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a determinação quantitativa da dexametasona em matéria-prima e comprimidos, visando a uniformização de metodologias em laboratórios de controle da qualidade. O método foi validado segundo as características de linearidade, faixa de concentração, exatidão, precisão e especificidade. A nova metodologia analítica apresentou-se linear ($r = 0,9994$), precisa ($CV = 0,03 - 1,74\%$) e exata (5% da concentração teórica), dentro da faixa de concentração estudada (20,0 - 30,0 $\mu\text{g/mL}$). Assim, o método analítico desenvolvido demonstrou-se útil para a quantificação da dexametasona em matéria-prima e comprimidos, podendo ser facilmente incorporado às análises de rotina em laboratórios de controle da qualidade de medicamentos.

SUMMARY. "Quantitative Determination of Dexamethasone in Raw Material and Tablets by High Performance Liquid Chromatography." This work shows a new analytical method by high performance liquid chromatography (HPLC) for quantitative determination of dexamethasone in raw material and tablets, with the purpose to uniformize methodologies in quality control laboratories. The method was validated with regard to linearity, range, accuracy, precision and specificity. These new method was linear ($r = 0.9994$), precise ($R.S.D = 0.03 - 1.74\%$) and accurate (5% of the nominal concentration), within the specific range (20.0 - 30.0 $\mu\text{g/mL}$). Therefore, this method can be useful for quantification of dexamethasone in raw material and tablets and easily employed for the routine analyses in drug quality control laboratories.

INTRODUÇÃO

A dexametasona (9-fluor-11 β ,17,21-triidroxi-16 α -metilpregna-1,4-dieno-3,20-diona, Figura 1) é um potente glicocorticoide sintético amplamente utilizado pelas suas propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras e empregado principalmente no tratamento das doenças do colágeno, artrite, asma brônquica, inflamações oculares e das doenças que decorrem de reações imunes indesejáveis, como a rejeição de transplante de órgãos ¹.

Na literatura científica pertinente, são encontrados alguns métodos para a determinação do teor de dexametasona em comprimidos, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. Todavia, estes métodos empregam fases estacionárias (colunas) usualmente não disponíveis em laboratórios de controle da

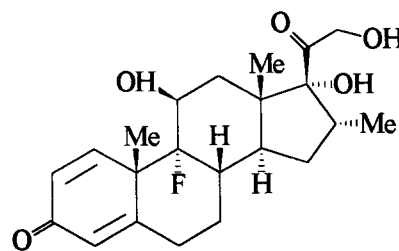


Figura 1. Estrutura molecular da dexametasona (MM = 392,50).

qualidade ², além de fases móveis que contribuem para a diminuição do tempo de vida útil de colunas e equipamentos ²⁻⁴.

Os métodos oficiais da Farmacopéia Americana ⁵ para a determinação do teor de dexametasona estão baseados na cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa utilizando-se

PALAVRAS CHAVE: CLAE, Dexametasona, Validação.
KEY WORDS: Dexamethasone, HPLC, Validation.

colunas C₈ e C₁₈ para matéria-prima e comprimidos, respectivamente. Já a Farmacopéia Britânica ⁶ apresenta uma metodologia baseada na espectrofotometria no ultravioleta para a determinação do teor de dexametasona na matéria-prima e cromatografia líquida de alta eficiência, para comprimidos.

Tendo em vista a ampla diversidade de metodologias que os laboratórios de controle da qualidade de medicamentos necessitam dispor, o objetivo deste estudo foi de uniformizar e validar uma metodologia analítica rápida, precisa e exata, para a determinação do teor de dexametasona em matéria-prima e comprimidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes e solventes

A substância de referência de dexametasona foi gentilmente cedida pela Prodome Química e Farmacêutica Ltda (São Paulo, Brasil). A matéria-prima para análise foi obtida da Merck do Brasil (Rio de Janeiro, Brasil). As amostras de comprimidos contendo 0,5 mg de dexametasona foram adquiridas comercialmente (lote: BB052, Fab.: fev/00 Venc.: fev/05, fabricante: Prodome). Acetonitrila, grau CLAE e água ultrapurificada.

Equipamentos e condições cromatográficas

O equipamento cromatográfico foi constituído de uma bomba Intralab 5050, um detector ultravioleta Intralab 5100, um integrador Intralab 4290 e uma válvula de injeção Rheodyne de 20 µL.

Foi utilizada como fase estacionária uma coluna Lichrospher® 100 (RP-18, 125 x 4 mm, com partículas de 5 µm, Merck) acoplada a uma pré-coluna RP-18 (Merck). A fase móvel foi constituída de uma mistura de água e acetonitrila (55:45 v/v), com vazão de 1 mL/min. A detecção foi realizada a 254 nm e o sistema cromatográfico operado à temperatura ambiente.

Validação da metodologia

A validação da metodologia para a determinação do teor de dexametasona em matéria-prima e comprimidos foi realizada avaliando-se as seguintes características: exatidão, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), linearidade, faixa de concentração e especificidade ^{5,7}.

Exatidão

A exatidão foi avaliada doseando-se, em triplicata, amostras de concentração conhecida (matéria-prima e comprimidos) adicionadas de três concentrações diferentes de substância de referência (2,5; 5,0 e 7,5 µg/mL).

Precisão

Para a determinação da repetibilidade foram preparadas e doseadas, em triplicata, no mesmo dia, três amostras do fármaco (matéria-prima e comprimidos) em concentrações diferentes (22,5; 25,0 e 27,5 µg/mL). Na determinação da precisão intermediária foram preparadas e doseadas, em triplicata, em três dias diferentes, amostras do fármaco (matéria-prima e comprimidos) na mesma concentração (25,0 µg/mL).

Linearidade

A linearidade do método foi determinada pela realização da curva de calibração. A partir da solubilização da substância de referência de dexametasona na fase móvel, foram preparadas cinco soluções (20,0; 22,5; 25,0; 27,5 e 30,0 µg/mL), dentro da faixa de 80-120% de uma concentração teórica de 25,0 µg/mL. A curva de calibração foi preparada e analisada em triplicata.

Faixa de concentração

A faixa de concentração testada foi de 20,0 a 30,0 µg/mL de dexametasona.

Especificidade

A especificidade do método foi avaliada pela comparação entre os cromatogramas obtidos para a substância de referência e as amostras (matéria-prima e comprimidos) e pelo ensaio de uma solução do placebo, contendo os possíveis interferentes da formulação (talco, amido, estearato de magnésio e manitol).

Preparação das amostras

Matéria-prima

Foram pesados 50,0 mg do pó e transferidos quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL, com auxílio de 45 mL de acetonitrila, deixando-se a solução em banho de ultrassom durante 5 minutos e completando-se o volume com água. Desta solução, foi transferida uma alíquota de 2,5 mL para um balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com a fase móvel e obtendo-se uma solução com uma concentração de 25,0 µg/mL.

Comprimidos

Foi determinado o peso médio de 20 comprimidos, os quais foram posteriormente pulverizados. Uma quantidade equivalente a 2,5 mg de dexametasona foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL, com auxílio de 45 mL de acetonitrila, submetendo-se a solução ao banho de ultrassom durante 5 min e à agitação

mecânica durante 30 min. Após, o volume do balão volumétrico foi completado com água e a solução filtrada em papel filtro quantitativo, obtendo-se uma solução com concentração de 25,0 µg/mL.

Preparação da solução padrão

Foram pesados 25,0 mg da substância de referência e transferidos quantitativamente para balão volumétrico de 50 mL com auxílio de 25 mL de acetonitrila, submetendo-se essa solução ao banho de ultrassom durante 5 minutos. Completou-se o volume do balão volumétrico com acetonitrila. Desta solução, foi transferida uma alíquota de 5,0 mL para um balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com a fase móvel e obtendo-se uma solução com concentração de 25,0 µg/mL. Foram preparadas três soluções padrão, analisadas em triplicata.

Cálculo do teor de dexametasona

A determinação do teor de dexametasona presente na matéria-prima e nos comprimidos foi realizada tanto pela interpolação dos resultados obtidos para a amostra na curva de calibração, quanto pela relação direta entre as soluções de amostra e substância de referência (padronização externa).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diante da ampla variedade de métodos que os laboratórios de controle da qualidade de me-

dicamentos necessitam dispor e das atuais exigências de validação de metodologias, o objetivo principal deste estudo foi de desenvolver e validar um método que pudesse ser utilizado na determinação do teor de dexametasona tanto em matéria-prima, quanto em comprimidos, utilizando-se equipamentos e reagentes usualmente disponíveis em laboratórios de controle da qualidade.

O método do padrão externo foi utilizado no desenvolvimento desta metodologia, já que este é simples, rápido e preciso para a preparação das amostras⁸. O tempo de retenção apresentado pela dexametasona foi de aproximadamente 2,21 min, sendo inferior àqueles já relatados na literatura²⁻⁴, evidenciando a maior rapidez na realização destas análises.

A curva de calibração para a dexametasona foi obtida plotando-se a concentração da solução em relação a área do pico cromatográfico obtido, demonstrando uma boa linearidade e atendendo as especificações, na faixa de 20,0-30,0 µg/mL. A equação da reta encontrada para a média das três curvas de calibração preparadas foi: $y = 35236,54 + 40296,41x$ ($n = 5$, $r = 0,9994$, $r^2 = 0,9988$, $p < 0,0001$).

Os resultados da avaliação da exatidão da metodologia encontram-se apresentados na Tabela 1 e demonstram uma exatidão satisfatória, com boa recuperação média das quantidades de substância adicionadas às amostras (matéria-prima: 103,68%; comprimidos: 98,74%).

Amostra	Concentração da substância de referência (µg/mL)		Recuperação (%)
	Adicionado	Encontrado	
Matéria-prima	2,50	2,56	102,49
	5,00	5,26	105,20
	7,50	7,76	103,48
	Média		103,68
Comprimidos	2,50	2,52	100,96
	5,00	4,91	98,11
	7,50	7,29	97,15
	Média		98,74

Tabela 1. Avaliação da exatidão do método cromatográfico para determinação da dexametasona em matéria-prima e comprimidos (n=3).

Na Tabela 2 encontram-se os resultados obtidos para o parâmetro de precisão, expresso como repetibilidade e precisão intermediária. Os coeficientes de variação encontrados na avalia-

ção da repetibilidade apresentaram-se dentro da faixa de 0,03 e 1,28% (matéria-prima: 0,24-1,28%; comprimidos: 0,03-0,97%). Já na avaliação da precisão intermediária, os coeficientes de

Amostra	Repetibilidade		Precisão Intermediária	
	Concentração (µg/mL)	Coefficiente de variação (%)	Dia do ensaio	Coefficiente de variação (%)
Matéria-prima	22,50	1,28	1	0,27
	25,00	0,24	2	0,24
	27,50	0,61	3	1,45
Comprimidos	22,50	0,97	1	1,74
	25,00	0,03	2	0,03
	27,50	0,83	3	0,97

Tabela 2. Avaliação da precisão (repetibilidade e precisão intermediária) do método cromatográfico para determinação da dexametasona em matéria-prima e comprimidos (n=3).

variação apresentaram-se numa faixa de 0,24 e 1,74% (matéria-prima: 0,24 - 1,45%; comprimidos: 0,03 - 1,74 %). O conjunto destes resultados (repetibilidade e precisão intermediária) demonstram que a metodologia analítica é dotada de precisão satisfatória para os fins a que se destina.

A especificidade de métodos cromatográficos utilizados na determinação do teor de substâncias ativas pode ser demonstrada pela análise

dos cromatogramas 7. A Figura 2 apresenta os cromatogramas obtidos para a substância de referência, matéria-prima e comprimidos, na concentração de 25,0 µg/mL, onde observa-se que não houve interferência de impurezas ou excipientes presentes nas amostras. Além disso, a partir do ensaio da solução do placebo, não foi encontrada influência dos possíveis interferentes da formulação (amido, talco, estearato de magnésio e manitol) no método cromatográfico.

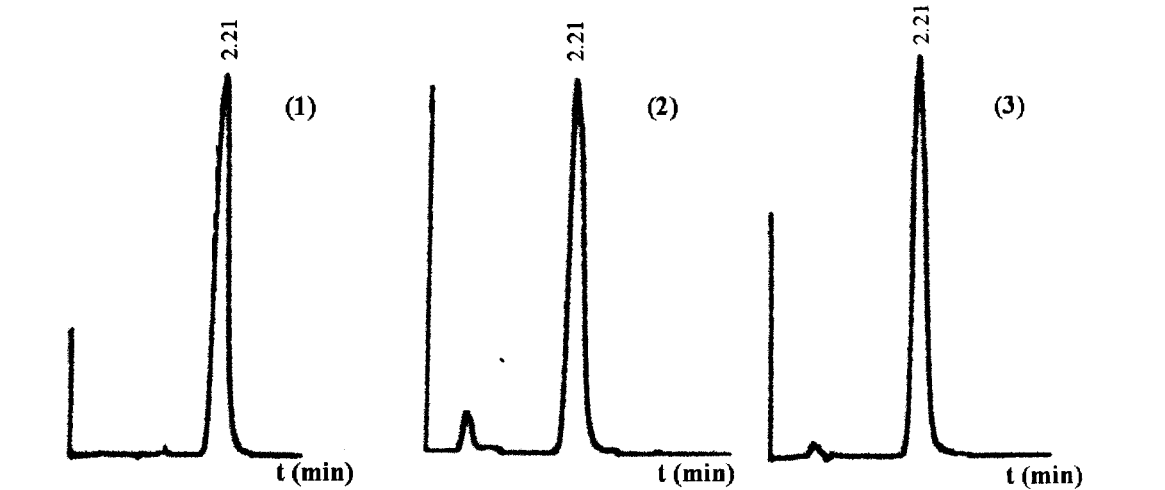


Figura 2. Cromatogramas da dexametasona (25,0 µg/mL): (1) substância de referência; (2) matéria-prima; e (3) comprimidos. Condições cromatográficas - coluna: Lichrospher® RP-18 (125 x 4 mm, 5 µm); fase móvel: água/acetonitrila (55:45 v/v); vazão: 1 mL/min; velocidade do papel: 0,5 cm/min; detecção: 254 nm; tempo de retenção: 2,21 min.

Após a etapa de validação, o método foi aplicado para a determinação do teor de dexametasona nas amostras - matéria-prima e comprimidos. Os resultados estão apresentados na Tabela 3, sendo que para ambas as amostras estes encontraram-se próximos a 100%, tanto pela interpolação na curva de calibração, quanto pe-

lo método da padronização externa (matéria-prima: 100,18% e 100,02%; comprimidos: 100,35% e 100,20%) e dentro da faixa de variação aceitável pela Farmacopéia Americana ⁵ de 97-102% e 90-110%, para matéria-prima e comprimidos, respectivamente.

Amostra	Concentração teórica	Concentração encontrada (média ± desvio padrão)	Teor (%)	Coefficiente de variação (%)
Matéria-prima	1000,00 mg/g	1001,82 ± 12,60 mg/g ^a	100,18 ^a	1,26 ^a
		1000,20 ± 12,18 mg/g ^b	100,02 ^b	1,22 ^b
Comprimidos	0,500 mg/comp.	0,502 ± 0,004 mg/comp. ^a	100,35 ^a	0,74 ^a
		0,501 ± 0,003 mg/comp. ^b	100,20 ^b	0,60 ^b

Tabela 3. Determinação do teor de dexametasona nas amostras de matéria-prima e comprimidos por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE (n=3).

^a Interpolação na curva de calibração. ^b Padronização externa.

CONCLUSÕES

A nova metodologia apresentada neste estudo demonstrou-se precisa, exata, linear, simples e rápida, dentro da faixa de concentração estudada, para a determinação quantitativa da dexametasona em matéria-prima e comprimidos.

Além disso, o método pode ser facilmente incorporado às análises de rotina, já que este requer reagentes e equipamentos usualmente disponíveis em laboratórios de controle da qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Schimmer, B.P. & K.L. Parker (1996) "Hormônio adreno-corticotrófico; esteróides adreno-corticais e seus análogos sintéticos; inibidores da síntese e das ações dos hormônios adreno-corticais", en *"As bases farmacológicas da terapêutica"* (Gilman, A.G., Rall, T. W., Nies, A. & P. Taylor, eds.), Impresses Universitaria SA, Santiago, pág. 1092
- Gupta, V. (1979) *J. Pharm. Sci.* **68**: 926-8
- Chen, S.-H, Wu, S.-H. & H.-L. Wu (1992) *J. Chromatogr.* **595**: 203-8
- Liu, K.-R, Chen, S.-H, Wu, S.-H., Kou, H.-S & H.-L. Wu (1994) *J. Chromatogr A.* **676**: 455-60
- The United States Pharmacopoeia, 24 Ed. (2000) US Pharmacopoeial Convention, Rockville, págs 511-5, 2149-52
- British Pharmacopoeia (1999) The Stationery Office, London, págs. 472-4
- International Conference on Harmonization (ICH): Validation of Analytical Procedures (1996) Comission of the European Communities
- Cardoso, S.G. & E.S. Schapoval (1999) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **19**: 809-12