

Desarrollo de un método espectrofluorométrico para determinar astemizol

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

Laboratorio de Análisis de Medicamentos, Facultad de Farmacia, Universidad de los Andes. Mérida, República Bolivariana de Venezuela.

RESUMEN

Se propone un nuevo método analítico para la valoración de astemizol (AZ) en materia prima, basado en la fluorescencia natural de la molécula ($\lambda_{exc}^{max} = 282$ y $\lambda_{em}^{max} = 425$ nm). El método permitió determinar AZ en una solución buffer de ácido clorhídrico – cloruro de potasio (pH 1,3), en un rango de 100 – 1000 ng/mL respectivamente, con un límite de detección estimado de 17 ng/mL. El método propuesto es más simple, rápido y económico que el método oficial de la farmacopea estadounidense (USP XXIV), y no requiere tratamiento previo de la muestra para convertir el AZ en otra especie química, como ocurre con los métodos espectrofotométricos. Se propone su aplicación a la determinación de AZ en formas farmacéuticas sólidas y muestras biológicas debido a la sensibilidad y especificidad inherentes al método.

ABSTRACT

A new spectrofluorimetric method for the determination of astemizole (AZ) in pure samples is described. It is based on the native fluorescence of the molecule. The proposed method allow the determination of 100 – 1000 ng/mL of AZ in aqueous solution containing hydrochloric acid – potassium chloride (pH 1.3) with $\lambda_{exc}^{max} = 282$ and $\lambda_{em}^{max} = 425$ nm, respectively. The proposed method is more simple, quick and economic than the official method (HPLC) of USP XXIV. It does not require previous treatment of the sample to transform the AZ molecule into another chemical specie, like it happens with the spectrophotometric methods. It could be applied to determine the substance in dosage forms and biological samples with a sensitivity of ng/mL.

PALABRAS CLAVE

Astemizol, Astemizole, Espectrofluorometría, Fluorescencia.

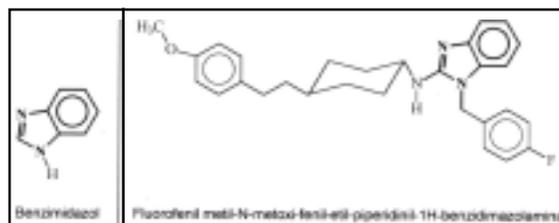
AGRADECIMIENTO

Al Laboratorio de Análisis de Medicamentos de la Facultad de Farmacia de la Universidad de los Andes donde se realizó este trabajo. A la Prof. Dorys Rojas por su valiosa colaboración en la revisión de los espectros de fluorescencia. Al Br. Raúl Oliveros por su valiosa colaboración en la revisión bibliográfica.

INTRODUCCIÓN

Astemizol (AZ) es un fármaco antihistamínico perteneciente a la categoría de los bloqueadores específicos de los receptores H1 de la histamina. Hismanal® (Janssen Pharmaceutica, Bélgica) es el nombre registrado para este medicamento. En la terapéutica se le conoce desde hace dos décadas, sin embargo no fue hasta el año 1998 cuando se le incluyó como fármaco oficial en la farmacopea de los EE UU (USP XXIII). El AZ se encuentra disponible en el mercado farmacéutico venezolano en tabletas (10 mg) y suspensión (2 mg/mL). Químicamente es un derivado benzimidazólico de nombre: 1-(4-fluorobencil)-2-[[1-(p-methoxyphenethyl)-4-piperidyl]benzimidazole (Fig. 1).

Figura 1. Relación estructural entre benzimidazol y astemizol



Diferentes métodos que han sido reportados para determinar AZ en materia prima, formas farmacéuticas y muestras biológicas:

1. Métodos de análisis de astemizol: análisis elemental, radioinmunoensayo, espectrofotometría ultravioleta y HPLC [Al-Obaid y Mian, 1991].

2. Determinación de astemizol en plasma sanguíneo por TLC. Técnica útil en los estudios de biodisponibilidad [Mangalan y Chakravarthy, 1991].

3. Aplicación de diferentes métodos analíticos a la determinación de astemizol (titulaciones en medios no acuosos, TLC, GC, espectrofotometría UV-visible) [Sane, 1993].

4. Evaluación de la pureza de astemizol por HPLC [Suryanarayana, et al., 1993].

5. Determinación de astemizol por HPLC usando yodo como complejo de transferencia de carga y método de detección [El Walily, et al., 1995].

6. Determinación de astemizol y desmetilastemizol en plasma humano a niveles de pg/mL [Buggé y Onur, 1995].

7. Determinación colorimétrica de astemizol en materia prima y formas farmacéuticas de dosificación usando la técnica de inyección por flujo [Alwarthan y Al-Obaid, 1996].

8. Determinación espectrofotométrica de astemizol mediante la formación de un complejo de transferencia de carga con ácido cloránico [Quereshi y Khan, 1996].

9. Determinación espectrofotométrica de astemizol en materia prima y formas farmacéuticas de dosificación [Sastry y Naidu, 1997].

10. Determinación de astemizol, terfenadina y clorhidrato de flunarizina mediante formación de un complejo ternario con eosina y plomo (II) [Kelani, et al., 1998].

11. Determinación espectrofotométrica de astemizol [Sastry y Naidu, 1998].

12. Método colorimétrico y método fluorométrico para determinar algunos antihistamínicos (astemizol) mediante la técnica de transferencia de carga usando colorantes ácidos [Karan, et al., 1999].

13. Nuevo método espectrofotométrico sensible para el análisis de algunos antihistamínicos [Daabees, 1999].

14. Determinación de astemizole por el método oficial de la farmacopea estadounidense [USP XXIV (Monografías Oficiales), 2000].

15. Determinación de astemizol en preparaciones farmacéuticas usando métodos espectrofotométricos [Gungor, 2001].

16. Aplicación de un sistema por inyección en flujo a la determinación cuantitativa de astemizol en formas farmacéuticas sólidas [Ovalles, et al., 2002].

El perfil analítico del AZ indica que la mayoría de los métodos se fundamentan en la detección espectrofotométrica ultravioleta-visible. Entre estos, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-UV), es un método muy útil en la determinación de AZ en formas farmacéuticas sólidas, sin embargo, es

relativamente costoso y requiere un tiempo considerable para optimizar los parámetros. Por lo tanto, el desarrollo de cualquier método menos sofisticado es significativamente deseable. Entre los métodos analíticos reportados en la literatura no se menciona alguno que se fundamente en emisión de fluorescencia, excepto una determinación indirecta, formando un par iónico fluoróforo con otra especie química [Karan, et al., 1999].

La fluorescencia es un fenómeno electrónico de emisión molecular que se presenta inmediatamente después de aplicarle al analito una fuente luminosa como energía de excitación. No todos los compuestos orgánicos son fluorescentes, de aquí la especificidad de esta técnica. Algunos hidrocarburos aromáticos y los heterocíclicos fusionados aromáticos son ejemplos de estructuras moleculares con fluorescencia natural. Los heterocíclicos sencillos carecen de fluorescencia natural debido a que se cree que la transición electrónica de más baja energía, implica un sistema $n \rightarrow \pi^*$, que rápidamente se transforma en un estado triplete e impide la fluorescencia. La molécula de AZ debería poseer fluorescencia natural porque en su estructura química está presente un heterocíclico benzimidazólico, y además, posee un grupo amino en la posición 2 (Fig. 1), el cual aumenta la densidad electrónica (donador de electrones π), y por lo tanto, la hipotética fluorescencia.

El objetivo de la investigación es desarrollar un método espectrofluorimétrico para valorar AZ en materia prima basado en la posible fluorescencia natural de la molécula. Hoy en día, no se conoce un método analítico fundamentado en este principio.

En este artículo se describe el desarrollo de un método espectrofluorométrico para cuantificar AZ en materia prima y su posible aplicación en la determinación de esta sustancia en formas farmacéuticas sólidas.

La investigación demostró que es posible determinar AZ por fluorescencia en un rango lineal entre 100 y 1000 ng/mL. El método presenta ciertas ventajas con respecto a las determinaciones por espectrofotometría UV-visible en términos de sensibilidad y especificidad, y referente a las determinaciones por HPLC, la rapidez y el bajo costo en términos de solventes orgánicos y equipo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Metanol grado HPLC (Mallinckrodt Chemical). Acetonitrilo grado HPLC (JTB). Ácido clorhídrico, grado analítico (Riedel-de Haën). Cloruro de potasio,

extra puro (Riedel-de Haën). Ácido sulfúrico 0,1 N, estandarizado (BDH CVS). Dietilamina, grado analítico 99,5% (BDH Chemicals Ltd, Poole England). Dihidrógeno fosfato de potasio, grado analítico, 99,5% (Riedel-De Haen AG S. 1). Acetato de amonio (Crystal reagent 0596-01. Baker Analyzed). Agua destilada. Soluciones buffer en forma de titrisoles, pH 1, 3, 5 y 11 (Merck). Las soluciones buffer de pH de 1,2 -2,2; 7,0 y 9,0 fueron preparados según procedimiento de la USP XXIV (2000). Sulfato de quinina dihidratada (BDH Chemicals Ltd, Poole England, Product N° 30010). 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 y Astemizol de marca fueron adquiridos en Farmacias de la localidad.

Instrumentación

Espectrofluorímetro Aminco-Bowman, provisto de un microfotómetro multiplicador J10-222A y un registrador tipo X-Y. Espectrofotómetro UV-visible Lamda 11 (Perkin-Elmer Corporation), acoplado con el programa computadorizado UV WinLab (Microsoft Corporation, Perkin-Elmer GbhM). Medidor de pH marca Orión. Dispositivo para filtración de polietileno Millex HV con membrana de filtración Durapore 0,45 µm.

PROCEDIMIENTO ANALITICO

Preparación de los sistemas disolventes

El AZ es prácticamente insoluble en agua, por lo tanto, la determinación de los espectros de excitación y emisión se evaluaron en diferentes solventes orgánicos solos o amortiguados. **S-1:** Cloroformo. **S-2:** Metanol. **S-3:** Acetonitrilo. **S-4:** Solvente orgánico (metanol o acetonitrilo) y una solución buffer (pH variable: 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 13) 50:50, v/v. **S-5:** Fase móvil utilizada para la determinación de AZ por HPLC según el método oficial (USP XXIV): [metanol-acetato de amonio (0,13 M)-acetonitrilo-dietilamina-ácido acético glacial (47:30:23:0,1:c.s.p. obtener pH 7,5)]. **S-6:** Acetonitrilo - solución de ácido clorhídrico 0,01 M (50:50, v/v). **S-7:** Metanol - solución de ácido clorhídrico 0,01 M (50:50, v/v). **S-8:** Metanol - solución de ácido clorhídrico 0,01 M (1:25, v/v). **S-9:** (Metanol para disolver AZ), diluido 1:50 con solución de ácido clorhídrico 0,01 M y éste a su vez diluido 1-5:25 (v/v) con la misma solución de ácido clorhídrico 0,01 M. **S-10:** (Metanol para disolver AZ), diluido 1:50 con solución buffer pH 1,3 (USP XXIV) y éste a su vez

diluido 1-5:25 (v/v) con la misma solución buffer; la solución buffer se preparó mezclando 25 mL de solución de cloruro de potasio 0,2 M con 33,6 mL de solución de ácido clorhídrico 0,2 M y agua destilada cantidad suficiente para 100 mL. **S-11:** Metanol (para disolver el AZ) diluido 1:50 con ácido acético 0,1 M y éste a su vez diluido 1-5:25 (v/v) con la misma solución de ácido acético 0,1 M.

Preparación de las soluciones

Solución patrón de sulfato de quinina. Se prepararon soluciones de 500, 5, 1 y 0,2 µg/mL, según el procedimiento recomendado por el catálogo del instrumento Aminco-Bowman. **Solución de AZ patrón (I):** se pesaron 0,0250 g de AZ patrón y se transfirieron cuantitativamente a un matraz aforado de 100 mL de capacidad con ayuda de metanol, se agitó durante 15 minutos en un ultrasonido para disolver y desgasificar y finalmente se enrasó con el mismo disolvente. **Solución intermedia de AZ patrón (II):** se midieron 2 mL de la solución I y se transfirieron a un matraz aforado de 100 mL de capacidad, se diluyó con el sistema disolvente S-10, se agitó durante 5 minutos en un ultrasonido y finalmente se enrasó con el mismo sistema disolvente. **Soluciones de trabajo de AZ patrón (III):** a partir de la solución II, se prepararon cinco soluciones patrones de trabajo en matraces aforados de 25 mL de capacidad, en un rango de concentración de 100 a 1000 ng/mL, utilizando como diluyente el sistema S-10. **Solución blanco (IV):** se preparó siguiendo el mismo procedimiento para las soluciones I, II, y III, tomando en cuenta la concentración final de metanol. **Solución de AZ muestra (V):** se pesaron 10 tabletas de cada producto farmacéutico, se pulverizaron y después se pesaron cantidades equivalentes a 0,0250 g de AZ. La muestra se transfirió cuantitativamente a un matraz aforado de 100 mL de capacidad con ayuda de metanol, se agitó durante 15 minutos en un ultrasonido para disolver y desgasificar y finalmente se enrasó con el mismo disolvente. **Solución intermedia de AZ muestra (VI):** una porción de la solución V se filtró, dos veces, usando un filtro Millipore de 0,45 mm, luego se midieron 2 mL y se transfirieron a un matraz aforado de 100 mL de capacidad, se diluyó con el sistema disolvente S-10, se agitó durante 5 minutos en un ultrasonido y finalmente se enrasó con el mismo disolvente. **Soluciones de trabajo de AZ muestra (VII):** a partir de la solución VI, se prepararon cinco soluciones muestra de trabajo en matraces aforados de 25 mL de capacidad, a una concentración de 600 ng/mL. El sistema disolvente S-10 se utilizó como diluyente.

Determinación de los espectros de emisión y excitación

Sulfato de quinina patrón. Se usó una solución de sulfato de quinina 0,2 µg/mL en ácido sulfúrico 0,1 N. Los espectros de excitación y emisión se obtuvieron y corrigieron colocando los respectivos diales de los monocromadores a 450 nm (longitud de onda de emisión) y 350 nm (longitud de onda de excitación). **Astemizol (AZ) patrón.** Una solución patrón de AZ (8 µg/mL), preparada en cada uno de los sistemas disolventes descritos, fue usada para obtener los espectros de excitación y emisión. La fluorescencia del analito fue explorada a diferentes longitudes de onda de excitación (250 – 350 nm; cada 20 nm). Los espectros obtenidos fueron comparados con los respectivos espectros derivados de las soluciones blanco. Los espectros de excitación fueron registrados a la longitud de onda de máxima intensidad relativa de fluorescencia y comparados con los respectivos espectros de emisión. Se estudió el efecto de la variación de la longitud de onda de excitación (250 – 300 nm; cada 4 nm) sobre la intensidad relativa de fluorescencia (IRF) del AZ en los sistemas disolventes apropiados.

Determinación de los fenómenos de inhibición de la fluorescencia

Se estudió el efecto de la concentración sobre la inhibición de la fluorescencia en dos series de soluciones: 0,1 – 1,0 µg/mL y 1 – 10 µg/mL. Se estudió el efecto de la irradiación ultravioleta (a la longitud de onda de excitación) sobre las dos series de soluciones de AZ patrón durante un periodo de 10 minutos. Se modificó la composición del sistema disolvente en términos de la fase orgánica, el pH de la solución y la fuerza iónica para determinar la influencia de éstos sobre la inhibición de la fluorescencia.

Ensayo de conveniencia del sistema

La fluorescencia natural de la molécula de AZ en diferentes medios se comprobó mediante sustracción de la señal del blanco [< 10 de IRF (de una escala arbitraria de 0 - 100)]. Las interferencias producidas por la dispersión de la luz y la difusión Raman del disolvente, observadas a una longitud de onda más larga que la correspondiente a la de excitación, fueron identificadas y descartadas como interferentes de la señal de emisión. La mínima concentración analítica y el efecto de atenuación debido a la concentración fue estudiada entre 0,01 y 10 µg/mL. El rango lineal se examinó entre 0,1 - 10 µg/mL, respectivamente. La curva patrón se construyó con las lecturas obtenidas entre 10 y 70 de IRF, sin sustraer el blanco. La curva patrón se preparó por duplicado y se registró una sola lectura

por cada solución patrón. La precisión dentro de series se determinó con una solución de AZ patrón intermedia (600 ng/mL) por duplicado y una solución de AZ muestra (600 ng/mL); en cada caso se registraron 5 lecturas. Todas las soluciones fueron preparadas el mismo día del ensayo. La calibración del instrumento se efectuó diariamente. El análisis estadístico de los datos y resultados se realizó con los programas Minitab 9,2 y Microcal Origen 5,0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se encontró que el astemizol (AZ) registra fluorescencia a una longitud de onda máxima de 425 nm a un máximo de excitación aproximadamente de 282 nm (Fig 2), bajo las condiciones instrumentales y químicas presentadas en la tabla 1. Estas longitudes de onda fueron seleccionadas para los ensayos de conveniencia del sistema y las determinaciones cuantitativas de AZ.

Los sistemas disolventes formados por metanol y ácido clorhídrico resultaron satisfactorios: el metanol absoluto aseguró la disolución total del AZ y luego se diluyó tantas veces como fuese necesario con una solución de ácido clorhídrico (0,1 – 0,01 M) para disociar la molécula de AZ. La solución de ácido clorhídrico 0,1 M, se sustituyó por ácido acético 0,1 M, para examinar la influencia de éste sobre la IRF; no se observó cambio aparente en la IRF y espectral. Las soluciones de AZ patrón preparadas en ácido sulfúrico 0,05 M no resultaron apropiadas debido a interferencias espectrales observadas. Los ensayos realizados con la fase móvil para HPLC del método oficial (S-5), aparentemente demostraron que la molécula no presenta fluorescencia en un medio amortiguado a pH 7 (± 1 unidad de pH). Los ensayos realizados con las soluciones de AZ en cloroformo (S-1) demostraron que la molécula presenta fluorescencia, sin embargo, se observó inhibición de la fluorescencia versus tiempo de exposición a la luz de excitación. Los sistemas amortiguadores de fosfatos, según preparación de la USP XXIV, también fueron ensayados, aunque se conoce que estos suelen inhibir la fluorescencia [Pradeau, 1998]. La inhibición de la IRF se observó por encima de un pH de 3; y resultó máxima por encima de un pH de 5. No se observó inhibición en la intensidad de fluorescencia de AZ a concentraciones $< 0,1$ M de cloruro de potasio. Las soluciones de AZ > 1 µg/mL, preparadas en una solución acuosa de ácido clorhídrico 0,01 M, mostraron una relación casi lineal negativa durante los primeros dos minutos de exposición a la radiación ultravioleta ($\lambda_{exc}^{max} = 282$ nm) y luego se estabilizaron. En el estudio de la influencia del pH sobre la IRF, utilizando una solución buffer de ácido

clorhídrico - cloruro de potasio de pH variable (1,0 - 3,0; cada 0,3 unidades) se encontró que la IRF no varió en el rango de pH entre 1,3 y 1,9. Por encima de un pH de 3 se fusionan el pico de dispersión de primer orden y el pico de emisión. El sistema disolvente seleccionado como óptimo para el resto de los ensayos fue el de pH de 1,3 (S-10).

El aspecto general del registro de un espectro de fluorescencia del AZ se presenta en la figura 2. La λ_{exc}^{max} se observó a 282 nm (espectro de excitación) y la λ_{em}^{max} se observó a 425 nm (espectro de emisión). En el espectro de emisión se observó que el primer pico correspondiente a λ_{exc}^{max} sufrió un desplazamiento hacia longitudes de onda más largas (282 nm \rightarrow 320 nm), sin embargo, no interfirió con el segundo pico correspondiente al máximo de emisión (425 nm) del AZ. El tercer pico ubicado a 605 nm, prácticamente el doble de la longitud de onda de excitación ($2 \lambda_{ex}^{max}$), observado tanto en el patrón de AZ, como en el blanco, correspondió a la emisión y dispersión de segundo orden. En el espectro de emisión de la figura 3 se observó un hombro aproximadamente a 280 nm y se repitió como pico de 2º orden a 560 nm, el cual puede explicarse como un fenómeno puramente óptico ya que aparece en todos los espectros, independientemente del disolvente utilizado. En este estudio se encontró una diferencia > 100 nm entre la longitud de onda de excitación y la longitud de onda máxima de emisión y una interferencia por parte del blanco prácticamente despreciable.

Experimentalmente se demostró que el AZ posee fluorescencia natural útil para desarrollar un método espectrofluorimétrico, tal como puede evidenciarse en el espectro de fluorescencia de la figura 2. La propiedad fluorescente del AZ asumimos que se debe a la fusión del anillo bencénico con el anillo imidazólico (Fig. 1), tal como ocurre con otros núcleos heterocíclicos como la quinoleína, la isoquinoleína y el indol, los cuales al aumentar la absortividad molar de la molécula fusionada, el tiempo de vida del estado excitado se hace más corto [Skoog et al., 2001]. El AZ posee un anillo aromático benzimidazólico que proporciona el centro cromóforo y centro fluoróforo, y un grupo amino en la posición 2 (Fig. 1), capaz de aumentar la densidad electrónica y por ende la fluorescencia. Adicionalmente, la estructura química del AZ posee dos sustituyentes no conjugados con el núcleo benzimidazólico que poseen ligero carácter fluoróforo: 4-fluorofenilo y 4-metoxifenilo (Fig. 1). Se conoce que existe una clara relación entre la densidad electrónica y la fluorescencia, ya que los grupos donadores π aumentan la fluorescencia (grupo amino secundario en la posición 2 del anillo heterocíclico). Se podría inferir inmediatamente que la protonación de este

grupo amino eliminaría la propiedad fluorescente del AZ, y consiguientemente la dependencia del pH sería considerable. Aunque esto es cierto, no siempre se cumple, basta con revisar la estructura de la misma quinina, la cual es fluorescente en medio ácido. En este estudio se encontró que la fluorescencia natural del AZ comienza a observarse en medios amortiguados a pH < 3. Los fundamentos teóricos fueron elucidados en parte por la literatura ya que Udenfriend (1962), reporta que el benzimidazol (Fig. 1) en ácido acético 0,1 N es altamente fluorescente ($\lambda_{exc}^{max} = 272$ nm) y ($\lambda_{em}^{max} = 365$ nm). De acuerdo con el criterio de la rigidez conformacional de las moléculas, que afectaría notablemente la fluorescencia, se podría inferir que la misma no repercutiría en la disminución de la fluorescencia porque este efecto no está directamente relacionado con la propiedad fluorescente, tal como ocurre con la estructura molecular de la quinina.

Tabla 1. Condiciones instrumentales y químicas.

Parámetro	Descripción	
Solución patrón de:	Sulfato de Quinina	Astemizol (AZ)
Concentración (µg/mL)	0,2	0,2 — 1,0
Solvente:	Ácido sulfúrico	(S-10)
Micro fotomultiplicador:	1	0,3
Macro fotomultiplicador:	0,1	2 (Fig 2) y 3 (Fig 3)
Trayecto óptico de la celda:	10 mm	
Longitud de onda del scanner:	600 n/min	
Ventana de salida del monocromador de excitación:	5,5 nm	
Ventana de entrada del monocromador de excitación:	11 nm	
Fuente de excitación:	Lámpara de Xenón	
Intensidad relativa de fluorescencia:	0 — 100 (escala arbitraria)	
Humedad del ambiente:	Controlada con equipo deshumidificador	
Temperatura del comportamiento de la celda:	Controlada por el instrumento	
Temperatura ambiente:	18 — 20 °C (controlada)	

Análisis cuantitativo y validación del método

Linealidad. La curva de calibración, intensidad relativa de fluorescencia (Y) versus concentración (X) expresada en ng/mL, resultó lineal en el rango 100 - 1000 ng/mL. Los resultados demostraron que las concentraciones inferiores a 100 ng/mL no presentan una intensidad relativa de fluorescencia significativa como para cuantificarla bajo las condiciones establecidas de sensibilidad. La serie de calibración en un rango de 1 - 10 µg/mL, no resultó útil debido a la observancia del efecto quenching o supresión de la fluorescencia por efecto de la concentración. En la figura 3 se observa la proporcionalidad entre cada una de las señales de IRF y las respectivas concentraciones de AZ. La propiedad fluorescente de las especies químicas suele ser útil desde el punto de vista

cuantitativo en el margen de 10^{-4} - 10^{-9} M [(Pradeau, 1998) (Connors, 1980)], ya que de esta manera se evita el efecto de adsorción sobre la superficie de la celda, la reabsorción de energía y la formación de exímeros [Guilbaut, 1967]. En el caso del AZ ($2,2 \times 10^{-7}$ y $2,2 \times 10^{-6}$ M) se obtuvo un rango lineal dentro de los límites de concentración permisibles. **Límite de detección.** De acuerdo con el Comité de Métodos Analíticos estadounidenses el límite de detección (LDD) debería ser: la concentración de AZ que corresponde a una señal equivalente a la media del blanco (YB) más tres veces la desviación estándar del blanco ($Y - YB = 3SB$), donde [$Y = a + (3 \times SB)$] y $YB = "a"$ en la ecuación de regresión ($Y = a + bX$) y para el límite de cuantificación se ha sugerido un valor de $YB + 10SB$ (Tabla 2). El límite de detección estimado según este convenio resultó 1 ng/mL y el límite de cuantificación en 10 ng/mL. **Precisión.** A pesar de las limitaciones del instrumento usado, se obtuvo un coeficiente de variación < 3% para los ensayos dentro de series. La precisión entre series no se consideró, como un factor crítico, debido a las mismas propiedades características de la fluorescencia, donde la calibración diaria se hace indispensable; no obstante, resultó < 5%. La aplicación del método analítico para determinar AZ en formas farmacéuticas sólidas demostró que es posible determinar AZ por el método propuesto. En primera instancia, no se observó diferencia espectral aparente entre el patrón de AZ y la muestra de AZ extraída de tabletas (Producto comercial y genérico). La precisión fue determinada efectuando en cada caso cinco determinaciones. La cuantificación de AZ tabletas se realizó por el método de calibración lineal en el rango de 200 - 1000 ng/mL con un coeficiente de correlación igual a la unidad (tabla 2). El porcentaje de AZ por tableta se determinó con un coeficiente de variación < 3% en cada caso. Los resultados de los estudios cuantitativos de AZ tabletas no se reportan debido a que no se contrastaron con el método oficial de la USP XXIV. No obstante, se obtuvieron resultados ligeramente inferiores a los encontrados por espectrofotometría UV [Ovalles, et al 2002], probablemente debido a la atenuación ocasionada por posibles restos del excipiente.

CONCLUSIONES

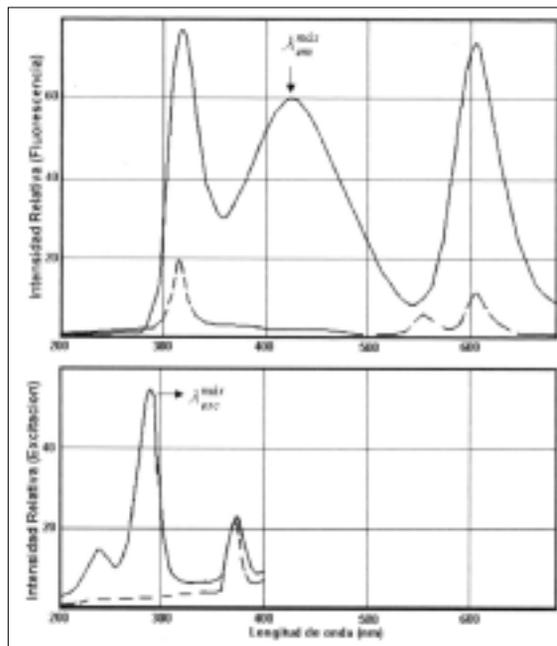
Se desarrolló un método analítico basado en la fluorescencia natural de la molécula de astemizol (AZ), hasta ahora no reportado en la literatura. El método espectrofluorométrico propuesto permite valorar materia prima de AZ en medios acuosos ácidos. Se considera que esta metodología es sencilla, reproducible y fácil de implementar en los laboratorios

que dispongan del respectivo equipo espectrofluorométrico. Las principales ventajas de este método con respecto al método oficial de la USP (HPLC) son la rapidez y el ahorro en solventes orgánicos. En lo que

Tabla 2. Datos estadísticos producto de la curva de calibración.

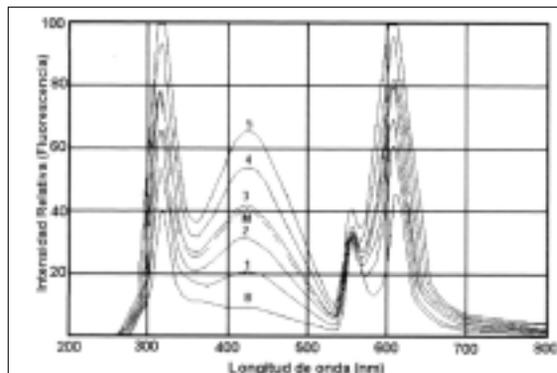
Parámetros	Datos
Ecuación de la recta de regresión	$Y = 0,0476 + 0,0472X$
Coefficiente de correlación (r)	0,9999
$S_{y/x} = SB$	0,2611
Desviación estándar de la pendiente (Sb)	0,0003
Desviación estándar de la ordenada (Sa)	0,1890
Nivel de confianza al 95% de "b"	0,047 + 0,001
Nivel de confianza al 95% de "a"	7,8 + 0,5

Figura 2. Aspecto general del espectro de fluorescencia del astemizol (AZ)



(—) Solución de AZ (0,6 µg/mL)
 (---) Solución blanco: solución buffer de HCl/KCl, pH = 1,3 (S-10)

Figura 3. Espectros de emisión característicos de una curva de calibración.



(—) AZ patrón (B, 1, 2, 3, 4 y 5 = 0, 200, 400, 600, 800 y 1000 ng/mL)
 (---) AZ muestra (M)

respecta a los métodos propuestos por espectrofotometría, no es necesario el tratamiento previo de la muestra con otra especie química, para convertirla en una sustancia detectable. El método desarrollado presenta además la ventaja de que la sensibilidad puede disminuirse hasta el rango de ng/mL. Aunque rara vez las cantidades de fármacos en las formas de dosificación son tan limitadas, el método podría ser aplicado a la determinación del fármaco en formas farmacéuticas sólidas. Para evitar cualquier posible interferencia del excipiente se sugiere la utilización del método de adición estándar y su respectiva comparación con el método oficial. Igualmente, se recomienda el desarrollo de un método por cromatografía de alta resolución (HPLC) utilizando la fluorescencia natural del astemizol, como nuevo método de detección.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Obaid, A. M., y Mian, M. S. 1991. **Analytical profile of astemizole.** Analytical profile of drugs substances. Academic Press. California. Vol. 20. P.177-178.
- 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. 14: 579-582.
- Buggé, C. J. L., Grün, I. U., Sullivan, M. P., Vatankhah, M., Tan, M. S., Chacon, E., Carlson, J. D., y García, D. B. 1995. **Determination of astemizole and desmethylastemizole in human plasma at low pg/mL levels.** Presented at the American Association of Pharmaceutical Scientists Annual Meeting [www.cedracorp.com/astemiz.htm (Feb. 2002)].
- Connors, K. A. 1980. **Curso de Análisis Farmacéutico.** Editorial Reverté. España. P. 267.
- Daabees, H. G. 1999. **A new sensitive spectrophotometric method for the analysis of some antihistamines.** Spectrosc. Lett. 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 Sci. 5: 403-408.
- Guilbault, G. G. 1967. **Practical Fluorescence.** Marcel Dekker. New York. P. 23-25, 44, 116.
- Gungor, S. y Onur F. 2001. **Determination of astemizole in pharmaceutical preparations using spectrophotometric methods.** J. Pharm. Biomed. Anal. 24 (3-4): 511-521.
- Karan, H., Elkousy, N. y Towakkol M. 1999. **Colorimetric and fluorometric methods for the determination of some antihistaminics using acid dyes and charge-transfer techniques.** Analytical letters. Vol. 32 (1): 79-96.
- Kelani, K., Bebawy, L. I., y Abdelfattah, L. 1998. **Determination of astemizole, terfenadine and flunarizine hydrochloride by ternary complex formation with eosin and lead (II).** Pharm. Biomed. Anal. 18: 986-992.
- Mangalan, S., Patel, R. B. y Chakravarthy, B. K. 1991. **Detection and determination of free and plasma protein bound astemizole by thin layer chromatography: Useful technique for bioavailability studies.** J. Chromatogr. Biomed. Appl. 567: 498-503.
- Ovalles, D. J. F., León, L. A., Buchheister, M. M. y Luna, J. R. 2002. **Aplicación de un sistema por inyección en flujo a la determinación cuantitativa de astemizol en formas farmacéuticas sólidas.** Revista de la Facultad de Farmacia (Universidad de Los Andes). Venezuela. Vol. 43: 29-33.
- Pradeau, D. 1998. **Análisis Químicos Farmacéuticos de Medicamentos.** Noriega Editores. México. P.633-634.
- Quereshi, S. Z. y Khan, M. A. 1996. **Spectrophotometric determination of astemizole by charge-transfer complex formation with chloranilic acid.** Analisis. 24 (5): 190-192.
- Sane, R.T. 1993. **Application of different analytical methods for the determination of astemizole from different dosage forms (non-aqueous titration, TLC, GC, UV-spectrophotometry, and colorimetry, are presented).** Indian Drugs. 30: 156-164.
- Sastry, C. S. P. y Naidu, P. Y. 1997. **Spectrophotometric determination of astemizole in pure and pharmaceutical formulations.** Indian Drugs. 34(3), 140-142.
- Sastry, C. S. P. y Naidu, P. Y. 1998. **Spectrophotometric determination of astemizole.** Talanta. 45(5): 795-799.
- Skoog, D. A., Holler, F. G. y Nieman, T. A. 2001. **Análisis Instrumental.** McGraw-Hill. España. P.381-401.
- Suryanarayana, M. V., Venkataraman, S., Reddy, M. S., Reddy, B. P., Sastry, C. S. P. y Krupadanam, G. L. D. 1993. **Evaluation of astemizole purity by HPLC.** Talanta. 40(9): 1357-1360.
- Udenfriend, S. 1962. **Fluorescence Assay in Biology and Medicine.** Academic Press. New York. P.270-271.
- USPXXIV. 2000. **Farmacopea de los Estados Unidos de América.** Oficial Monographs. USP 23-NF 18 (hasta el suplemento 9). Copyright 1996-1998 USPC, Inc.