

MICROESFERAS DE SUCCINATO ÁCIDO DE VITAMINA E PARA EL TRATAMIENTO DE LA PVR. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO POR HPLC

Concepción Martínez Sancho, Rocío Herrero Vanrell, Sofía Negro Álvarez

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid.

Introducción

La vitreoretinopatía proliferativa (PVR) es uno de los efectos secundarios que se producen con más frecuencia después de un proceso quirúrgico intraocular. Para su prevención se administran distintos agentes terapéuticos, que, en la mayoría de los casos, resultan tóxicos para la retina. La vitamina E y sus derivados, resultan efectivos en la disminución del desarrollo de la PVR en animales, sin presentar toxicidad, siendo a su vez el succinato ácido de vitamina E el que presenta una mayor actividad antiproliferativa (1).

La PVR se origina en los primeros días después de la cirugía, por ello la liberación controlada del succinato ácido de vitamina E a partir de un sistema biodegradable (microesferas de ácido poli-láctico-co-glicólico) puede ayudar a crear condiciones que eviten el desarrollo posterior de la enfermedad (2).

Existen varios métodos que permiten cuantificar tanto la vitamina E como el acetato de vitamina E *in vitro* e *in vivo* (3-5). Sin embargo, las técnicas descritas para la cuantificación de succinato de vitamina E son poco sensibles, con límites de cuantificación del orden de mg/ml.

El objetivo de este trabajo es el desarrollo y validación de un nuevo método analítico por HPLC más sensible que permita la detección y cuantificación del succinato ácido de vitamina E en microesferas biodegradables.

Materiales y Métodos

Materiales. Polímero derivado del ácido poli-d,l-láctico-co-glicólico (PLGA) 50:50 (Resomer®502, Boehringer Ingelheim), d- α -tocoferol succinato ácido (Sigma), metanol (Lab-Scan), ácido acético (Merck), agua de grado HPLC (Millipore), diclorometano (Merck) y etanol (Merck).

Para la cuantificación de las muestras se utilizó un cromatógrafo Gilson (Middleton, USA) provisto de una bomba modelo 305, un detector UV/Vis mod.118 y un controlador 712.

Método de elaboración de las microesferas.

Se utilizó la técnica de evaporación del solvente a partir de una emulsión O/A (6). 400 mg de polímero y 40 mg de succinato ácido de vitamina E se disolvieron en 1 ml de diclorometano. La disolución polimérica se añadió a 100 ml de una solución acuosa de alcohol polivinílico de concentración 0,1% y se mantuvo en agitación continua durante 3 horas, hasta la completa evaporación del disolvente orgánico. Después del proceso de maduración, las microesferas fueron lavadas, filtradas y liofilizadas.

Determinación del principio activo a partir de las microesferas.

El contenido en principio activo de las microesferas se determinó disolviendo una cantidad determinada de microesferas (10 mg) en 1 ml de diclorometano. A dicha muestra se le incorporaron 15 ml de etanol (volumen óptimo) con el fin de precipitar el polímero. El contenido en succinato ácido de

252 VI Congreso SEFIG y 3^{as} Jornadas TF

vitamina E se determinó después de su centrifugación.

Condiciones de trabajo. Fase móvil: metanol:agua (pH 3) (97:3; v/v) a pH*5,6, flujo: 2 ml/min, λ = 284 nm y volumen de inyección 20 μ l. La separación cromatográfica se realizó con una columna Extrasil ODS-2 (5 μ m, 250x 4 mm) (Teknokroma) conectada a una guardacolumna ODS.

Validación. Los parámetros de validación estudiados son linealidad, rango, límite de cuantificación y detección, exactitud, precisión, especificidad, estabilidad y robustez (7-11).

Linealidad, rango, límite de cuantificación y detección. Se prepararon diez muestras de concentraciones comprendidas entre 15-210 μ g/ml en diclorometano:etanol (1:15). Las muestras fueron preparadas por triplicado y cada muestra fue valorada por duplicado.

Exactitud. La exactitud se evaluó a partir de diez muestras, de distintas concentraciones, preparadas en tres días distintos.

Precisión. Los parámetros de precisión se calcularon a partir de muestras de concentración 120 μ g/ml preparadas, por sextuplicado, en 3 días diferentes.

Especificidad. Se estableció la posible interferencia tanto de los constituyentes de la microesferas, como de los productos de degradación.

Estabilidad. Se evaluó la estabilidad del succinato ácido de vitamina E en diclorometano:etanol (1:15) a concentraciones de 15 μ g/ml y 210 μ g/ml, después de su almacenamiento a 25°C durante 48 horas. Así mismo, se evaluó la estabilidad en las condiciones descritas para la extracción.

Robustez. Se evaluó mediante el análisis de distintas muestras y lotes de microesferas. Las determinaciones se llevaron a cabo días

diferentes y utilizando columnas, guardacolumnas y lotes de reactivos distintos.

Todas las muestras se manipularon protegidas de la luz.

Resultados y Discusión

La validación de un nuevo método analítico por HPLC que permita la detección y cuantificación del succinato ácido de vitamina E, en microesferas biodegradables, resulta de gran interés.

Inicialmente se aplicaron los métodos descritos en la bibliografía para la cuantificación de vitamina E y acetato de vitamina E, no obteniéndose resultados satisfactorios.

Con el fin de establecer las condiciones óptimas de ensayo se analizaron distintas proporciones metanol:agua desde un rango 99,5:0,5 hasta 75:25, con y sin ajuste de pH. El rango de pH de la fase móvil ensayada osciló entre 4,5-7. Los mejores resultados se obtuvieron con la proporción metanol:agua (97:3) (v/v) a pH 5,6; previa acidulación del agua con ácido acético hasta pH 3. Para estas condiciones experimentales el tiempo de retención resultó ser 6,5 min., manteniéndose estable en todas las muestras analizadas.

Los resultados correspondientes al estudio de linealidad se resumen en la tabla 1. El método desarrollado resultó ser lineal en el rango de concentraciones de 15-210 μ g/ml.

El límite de cuantificación (LC) fue 15 μ g/ml y el límite de detección (LD) de 3 μ g/ml.

El porcentaje de recuperación media en los estudios de exactitud fue 100,23 \pm 1,16%.

Los porcentajes de recuperación obtenidos en los estudios de precisión oscilaron entre un 97,00–103,48%, con un CV_r (interensayo) y de CV_R (interdía) de 2,08 y 2,32; respectivamente.

Tabla 1 Resultados obtenidos en los estudios de linealidad

Ordenada en el origen	8130,17		
Error estándar de la ordenada en el origen	4680,26		
Intervalo de confianza de la ordenada en el origen	-1455,01 – 17715,36		
Pendiente	4469,87		
Error estándar de la pendiente	41,48		
Intervalo de confianza (95%)	4384,90 – 4554,85		
Coefficiente de correlación (r)	0,9988		
	Valor calculado	Valor tabulado	Nivel de significación
Existencia de pendiente	11606,67	4,20	AS*
Falta de ajuste	0,38	2,45	NS**
Igualdad de variancias	0,2928	0,4450	NS**

*AS: altamente significativo (P=0,05); **NS: no significativo (P=0,05)

Los componentes utilizados en la elaboración de las microesferas no presentaron picos cromatográficos en la región de elución del succinato ácido de vitamina E. Tampoco se observaron interferencias del succinato ácido de vitamina E con la vitamina E ($R_s > 2$).

Los estudios de estabilidad indican que las soluciones fueron estables durante el periodo de almacenamiento.

El estudio de robustez demostró que los resultados obtenidos no varían con el tiempo o las condiciones de ensayo.

El rendimiento medio de encapsulación para las microesferas de succinato ácido de vitamina E, obtenido en el proceso descrito, resultó ser del 96,53%.

En conclusión, el método propuesto resulta válido para la cuantificación de succinato ácido de vitamina E por HPLC en microesferas de ácido poli-láctico-co-glicólico.

Bibliografía

- J.M. Larrosa, A.S. Veloso, F-L. Leong, M.F. Refojo, Antiproliferative effect of intravitreal alpha-tocopherol and alpha-tocopheryl-acid-succinate in a rabbit model of PVR, *Curr. Eye Res.*, 16, 1030, (1997).
- T. Sakamoto, D.R. Hinton, H. Kimura, C. Spee, R. Gopalakrishna, S.J. Ryan, Vitamin E succinate inhibits proliferation and migration of retinal pigment epithelial cells in vitro: therapeutic implication for proliferative vitreoretinopathy, *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 234, 186, (1996).
- D.W. Nierenberg, D.C. Lester, T.A. Colacchio, Determination of tocopherol and tocopherol acetate concentrations in human heces using high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 413, 79, (1987).
- A. Celardo, A. Bortolotti, Measurement of vitamin E in premature infants by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 490, 432, (1989).
- J.P. Koskas, J. Cillard, P. Cillard, Separation of α -tocopherol, α -tocopherol quinone and α -tocopherol-dimer by reversed-phase high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 287, 442, (1984).
- L.R. Beck, D.R. Cowsar, D.H. Lewis, R.J. Cosgrove, C.T. Riddle, S.L. Lowry, T. Epperly, A new long-acting injectable microcapsule system for the administration of progesterone, *Fertil. Steril.*, 31, 545, (1979).
- J. Caporal-Gautier, J.M. Nivet, Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP I. *Méthodologie*, S.T.P. Pharma, 2, 205, (1992).
- J. Caporal-Gautier, J.M. Nivet, Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP II. Exemples d'application, S.T.P. Pharma, 2, 227, (1992).
- R.C. Causon, Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion, *J. Chromatogr. B*, 689, 175, (1997).
- International Conference on Harmonization, <http://www.ifpma.org>.
- F. Brellose, M. Bromet-Petit, M. Audran, Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. applications to pharmacokinetics, *J. Chromatogr. B*, 686, 3, (1996).

254 VI Congreso SEFIG y 3^{as} Jornadas TF

Autor de contacto:

Concepción Martínez Sancho

soneal@farm.ucm.es

Departamento de Farmacia y Tecnología

Farmacéutica. Facultad de Farmacia. UCM.

Plaza de Ramón y Cajal s/n

28040 Madrid

Tel.:913941739

Fax:913941736