



## **Desarrollo y validación de un método espectrofluorométrico para la determinación de furosemida en formas farmacéuticas sólidas**

**Alexis Buitrago<sup>\*1</sup>, Laura Calderón<sup>1</sup>, Andrés León<sup>1</sup>, Rosario Brunetto<sup>2</sup>, Máximo Gallignani<sup>2</sup>.**

- 1) Laboratorio de Análisis de Medicamentos. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. Mérida 5101, Venezuela.
- 2) Laboratorio de Espectroscopia Molecular. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes. Mérida 5101, Venezuela.

(\*) [alexisb@ula.ve](mailto:alexisb@ula.ve).

**Recibido:** 07/12/2009

**Aceptado:** 01/02/2010

### **Resumen:**

El presente trabajo tiene como objetivo desarrollar y validar un método analítico alternativo, por espectrofluorimetría, para el control de calidad de la Furosemida en formas farmacéuticas sólidas, basado en la fluorescencia nativa que presenta la molécula en medio ácido ( $\lambda_{Exc.} = 280\text{nm}$  y  $\lambda_{Emi.} = 410\text{nm}$ ). El método permite determinar la Furosemida en una solución amortiguadora de ácido clorhídrico-cloruro de potasio 50mM (pH 2,0), en el intervalo de  $1,45 \times 10^{-7}$  a  $1,51 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  (4,5 a 5000 ng mL<sup>-1</sup>), con un límite de detección estimado de  $4,84 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  (1,5 ng mL<sup>-1</sup>). El método propuesto presenta como ventajas competitivas frente al método oficial reportado en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 29): su simplicidad, el bajo costo y una frecuencia de análisis cercana a las 20 muestras por hora.

**Palabras claves:** Furosemida; espectrofluorimetría; formas farmacéuticas sólidas

### **Abstract**

The aims of this work is to develop and validate an alternative analytic method by spectrofluorometry for the quality control of Furosemide in solid pharmaceutical forms based on the native fluorescence of the molecule in acidic medium ( $\lambda_{Exc.} = 280\text{nm}$  and  $\lambda_{Emi.} = 410\text{nm}$ ). This method allows to determine Furosemide in a buffer solution of potassium chloride-hydrochloric acid 50 mM (pH 2.0) in a range of  $1.45 \times 10^{-7}$  to  $1.51 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  (4.5 to 5000 ng mL<sup>-1</sup>), with an estimated detection limit of  $4.84 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  (1.5 ng mL<sup>-1</sup>). The proposed method offers, as competitive advantages comparing to the official method reported in the United States Pharmacopeia (USP 29), its simplicity, low cost and frequency of analysis, around 20 samples per hour.

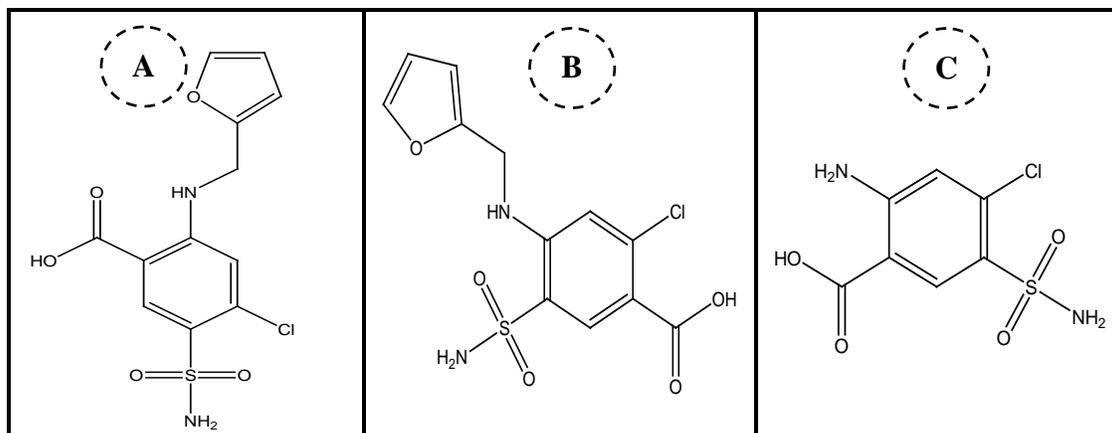
**Key words:** Furosemide; spectrofluorometric; solid pharmaceutical forms

### **Introducción**

La Furosemida (**FUR**) es un derivado del ácido antranílico y pertenece al grupo de los diuréticos que actúan sobre el asa de Henle. En la actualidad, se utiliza ampliamente para el tratamiento de enfermedades renales, cerebrovasculares y cardiovasculares, tanto en forma aislada (único componente activo) como en combinación con otros antihipertensivos ( $\beta$ -bloqueadores)<sup>1,2</sup>. Desde su aprobación por la Oficina para la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés)<sup>3</sup> como especialidad farmacéutica en 1979, se sigue utilizando debido a su alta efectividad, bajo costo y mínimo efecto

secundario. La diuresis comienza al menos 30 minutos después de la administración enteral; y a los 5 minutos cuando se administra por vía parenteral<sup>4</sup>. La **FUR** se encuentra en el mercado en diferentes presentaciones: comprimidos (20, 40 y 80 mg), suspensión (10 mg mL<sup>-1</sup>), gotas (1 mg mL<sup>-1</sup>) y solución inyectable (10 mg mL<sup>-1</sup>)<sup>5</sup>.

La **FUR** (ácido 4-cloro-2-[2-furilmetilamino]-5-sulfamoil benzoico) tiene un peso molecular de 330,745 g mol<sup>-1</sup> y fórmula molecular de C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S (ver Figura 1A). Presenta dos constantes de disociación que le confieren un carácter ácido-base (pK<sub>a1</sub>= 3,8 y pK<sub>a2</sub>= 7,5). Se trata de un polvo blanco cristalino e inodoro; prácticamente insolu-



**Figura 1:** Estructura de la Furosemda (**FUR**) y de algunas impurezas de síntesis. (**A**): **FUR**: (ácido 4-cloro-2-[2-furilmetilamino]-5-sulfamoilbenzoico). (**B**): compuesto relacionado A (ácido 2-cloro-4-N-furfurilamino-5-sulfamoilbenzoico). (**C**): compuesto relacionado B (ácido 4-cloro-5-sulfamoilantranílico).

ble en agua, escasamente soluble en alcohol; pero libremente soluble en soluciones alcalinas diluidas<sup>6</sup>.

La Farmacopea de los Estados Unidos de América 29 (USP, por sus siglas en inglés)<sup>7</sup> reporta la utilización de la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) para la cuantificación de la **FUR** en formas farmacéuticas sólidas y líquidas, así como también para la determinación de algunas impurezas obtenidas de la síntesis del fármaco (ver Figuras 1B y 1C), identificadas como: compuesto relacionado A (ácido 2-cloro-4-N-furfurilamino-5-sulfamoilbenzoico) y compuesto relacionado B (ácido 4-cloro-5-sulfamoilantranílico). En la literatura especializada se encuentran descritos diversos métodos de análisis para la determinación de **FUR** en materia prima, formas farmacéuticas y fluidos biológicos, que utilizan diferentes técnicas analíticas como son: volumetría,<sup>8,9</sup> potenciometría<sup>10-11</sup>, Absorción molecular (UV-Vis)<sup>12-15</sup>, Espectroscopia infrarroja<sup>16,17</sup>, CLAR<sup>18-20</sup>, Luminiscencia (Quimio-luminiscencia<sup>21,22</sup> y Fluorescencia molecular<sup>23-25</sup>), entre otras.

La *Fluorescencia Molecular* es una técnica espectroscópica que, desde el punto de vista analítico, resulta interesante y atractiva para el analista, debido a la sensibilidad y selectividad que la caracterizan, que suelen ser muy superiores a las inherentes a la *Absorción Molecular* Uv/Vis. Sin embargo, su aplicación se ve restringida a un número limitado de sistemas químicos que presentan fluorescencia nativa. Esta restricción tiene su origen en diversos mecanismos de desactivación que favorecen la liberación del exceso de energía presente en las moléculas excitadas, mediante procesos no radiantes. Por ello, en muchos casos, se requiere la conversión previa del analito en una nueva especie química con características ambientales y estructurales que favorecen el

proceso fluorescente, mediante una reacción de derivatización<sup>26</sup>.

En la literatura se encuentran descritos algunos trabajos que se focalizan en la determinación de **FUR** y que tienen por fundamento la fluorescencia nativa de esta molécula. En esa vía, Forrey y colab.<sup>23</sup> desarrollaron un método para la determinación de **FUR** y ácido 4-cloro-5-sulfamoilantranílico en muestras de suero y orina. Inicialmente separan al principio activo farmacéutico (**PAF**) de la matriz, mediante un proceso de extracción discontinua. Para ello, colocan 1 mL de la muestra -suero u orina- en una mezcla de éter di-etílico/ éter / buffer de fosfato de potasio 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH= 7,0) en proporción 50:40:10. En una primera etapa, para la determinación selectiva de **FUR**, acidifican la fase acuosa hasta un pH de 1,0 con ácido clorhídrico 0,6 mol L<sup>-1</sup> y realizan la medida fluorescente, fijando las longitudes de onda de excitación ( $\lambda_{Exc.}$ ) y emisión ( $\lambda_{Emi.}$ ) en 342nm y 417nm, respectivamente. La segunda etapa del método la enfocan sobre la determinación del compuesto relacionado B. Para este fin, ajustan el pH de la fase acuosa en 6,0 unidades (con hidróxido de sodio 0,1 mol L<sup>-1</sup>) y evalúan la señal analítica bajo las mismas condiciones instrumentales.

Por su parte, Llorent-Martínez y colab.<sup>24</sup> utilizan un sistema de multiconmutación de válvulas solenoides acoplado a un optosensor de fluorescencia para la determinación simultánea de **FUR** y triamtereno en preparaciones farmacéuticas sólidas y fluidos biológicos. El método que describen no requiere de tratamiento previo de la muestra; y consiste en separar a los analitos mediante el uso de una mini-columna rellena con Sephadex SPC-25; y su posterior detección -por fluorescencia-, utilizando como interfase una celda de flujo. Para realizar la determinación simultánea de ambas especies, realizan un

monitoreo de la respuesta fluorescente a diferentes longitudes de onda de excitación y emisión, generando por esta vía un espectro tridimensional, que es característico para cada uno de los **PAF**. Bajo las condiciones seleccionadas, para la **FUR** encuentran respuesta lineal entre 50 a 1200 ng mL<sup>-1</sup>, con un límite de detección de 15 ng mL<sup>-1</sup>; mientras que para el triamtireno los parámetros obtenidos fueron de 0,4 a 8,0 ng mL<sup>-1</sup> y 0,1 ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Más recientemente, Semaan y colab.<sup>25</sup> describen el uso de un sistema de análisis por inyección en flujo, que incorpora detección fluorescente, para la determinación de **FUR** en formulaciones farmacéuticas y muestras biológicas. En este diseño, se introduce un segmento discreto de la muestra (estándar) en una solución portadora (un buffer fosfato, de pH 3,0), a través de un puerto de inyección. En el desarrollo del trabajo, los investigadores añaden en el montaje un canal adicional que permite introducir al sistema un surfactante catiónico (CTBA 9x10<sup>-4</sup>), con el propósito de incrementar la sensibilidad del método. En este punto, es importante recordar que está bien descrito en la literatura que la mayor ventaja que aportan los medios miscelares, o medios organizados, es un incremento -notable- en la sensibilidad<sup>27</sup>. La intensidad de la emisión fluorescente se evaluó a 410nm, fijando  $\lambda_{Exc}$  en 270nm. Bajo estas condiciones de trabajo, reportan un intervalo dinámico entre 1,0x10<sup>-7</sup> y 1,0x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>, con un límite de detección de 3,0x10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup>.

El principal objetivo de este trabajo fue desarrollar un método espectrofluorométrico simple, para la determinación de **FUR** en formas farmacéuticas sólidas. El método propuesto, que se fundamenta en la fluorescencia nativa que presenta la molécula de **FUR** en un medio ácido de pH regulado (pH = 2,0), es sencillo, de bajo costo y de fácil implementación. Además, sus figuras de mérito son muy apropiadas para la aplicación que se persigue. Por todo esto, podría ser adecuado para realizar, de forma rutinaria, el control de calidad de este tipo de fármacos.

## Parte experimental

### *Equipos y accesorios*

Las medidas de fluorescencia fueron realizadas con un espectrofluorímetro Aminco-Bowman (J4-8960), provisto de un microfotómetro multiplicador (J10-222A) y un registrador tipo X-Y (Maryland, USA). El desarrollo de este trabajo requirió, adicionalmente, el uso de diversos equipos y accesorios como: medidor de pH Oakton modelo 450 (OAKTON Instruments, USA), baño ultrasónico Elmasonic modelo E 120 (Elma, Germany), unidad de filtración Millipore de 0,45µm de diámetro de poro (Milford, Massachusetts, USA) y rotavapor, modelo

51111 (Heidolph Instruments GmbH & Co., Germany). Para la validación y contraste del método propuesto se utilizó un cromatógrafo para fase líquida de alta resolución (CLAR) con detección UV Waters (Milford, Massachusetts, USA).

### *Reactivos y muestras*

El patrón de trabajo de Furosemda, analizado por Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN-H<sup>1</sup>) con un 99,8% de pureza, así como los diversos excipientes (Iudipress, PVP K-30, explotab y talco) empleados en la preparación de los comprimidos, fueron proporcionados por el Laboratorio Valmor C.A (Mérida, Venezuela). Todos los reactivos usados fueron de grado analítico y se obtuvieron de las siguientes fuentes: acetonitrilo (ACN) grado CLAR, cloruro de sodio de Merck (Darmstadt, Germany); ácido clorhídrico e hidróxido de sodio de Reidel-de-Haën (Seelze, Germany); sulfato de quinina dihidratada de Sigma-Aldrich (St. Louis-MO, USA) y tetrahidrofurano grado CLAR de Burdick & Jackson (Muskegon-MI; USA). Se preparó una solución amortiguadora, como medio de disolución para muestras y estándares, a partir de ácido clorhídrico-cloruro de potasio (Clark & Lubs buffer); elaborada según el procedimiento descrito en la USP 29.<sup>7</sup> En la preparación de esta solución, así como de otras soluciones de trabajo, se utilizó agua ultrapura (18 MΩ.cm de resistividad), suministrada por un sistema Milli-Q plus (Water. Millipore, Milford MA, USA).

Las diferentes muestras comerciales del medicamento utilizadas para el desarrollo del trabajo, que se identificaron en el texto como **MA** (innovador) y **MB**, **MC**, **MD** (genéricos), corresponden sólo a formulaciones sólidas que producen los Laboratorios nacionales y fueron adquiridas en diferentes farmacias de la localidad.

### *Preparación de la curva de calibración*

La solución madre de **FUR** fue preparada diariamente en ACN a una concentración de 3,02x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> (1000 µg mL<sup>-1</sup>) y almacenada en frasco ámbar a temperatura ambiente. Una solución intermedia de concentración 3,02x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> (100 µg mL<sup>-1</sup>) se preparó a partir de la solución madre por dilución con agua ultra pura. Para la realización de la curva de calibración de seis puntos (0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 y 5,0 µg mL<sup>-1</sup>), se tomaron de la solución intermedia los correspondientes volúmenes y se diluyeron con la solución amortiguadora de ácido clorhídrico-cloruro de potasio.

### *Preparación de la solución muestra*

Inicialmente se pesan, y se calcula el peso promedio, de -al menos- 20 comprimidos que declaran contener 40 mg de **FUR** por unidad. Se trituran y pulverizan hasta obtener un

fino polvo, homogéneo y representativo, de la muestra. A continuación, se pesan con exactitud porciones del polvo, equivalentes a 50 mg de **FUR**, de las diversas muestras (**MA**, **MB**, **MC** y **MD**), se transfieren a matraces volumétricos de 50 mL con la ayuda de ACN y se someten a ultrasonido durante 15 minutos. Por último, se llevan a línea de aforo con el mismo solvente. Las soluciones resultantes, de concentración  $3,02 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) son almacenadas en frascos ámbar y se utilizan para preparar, por dilución apropiada en la solución amortiguadora de HCl/KCl, las soluciones-muestra definitivas, cuya concentración nominal es de  $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . En este punto, las soluciones-muestra están listas para su análisis por fluorescencia.

### Discusión de resultados

Para la puesta a punto del método que se propone, inicialmente se estudió la influencia que tienen sobre la fluorescencia de la molécula de **FUR** algunos parámetros instrumentales y del sistema químico bajo estudio, como son: pH de la solución amortiguadora, longitud de onda de excitación y emisión, intercambiabilidad de la sal en la solución amortiguadora y temperatura. En estas experiencias se utilizó como referencia un estándar de **FUR** ( $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) preparado en solución amortiguadora de HCl/KCl, que será designada a lo largo del texto como **S0**.

#### Optimización de parámetros experimentales

##### Estudio del efecto del pH sobre la intensidad de la fluorescencia

Este estudio consistió en evaluar el efecto que tiene el pH sobre la señal analítica del estándar de referencia (**S0**); ajustando el pH entre 1,5 y 2,5 en intervalos de 0,1 unidades. La máxima intensidad de fluorescencia de estas soluciones, corregida por sustracción de la señal del blanco y expresada en unidades arbitrarias de fluorescencia (**UAF**), se determinó de forma manual, fijando la longitud de onda para la excitación ( $\lambda_{\text{Exc.}}$ ) en 265nm y para la emisión ( $\lambda_{\text{Emi.}}$ ) en 400nm, que son valores de referencia.<sup>20</sup> Como se puede observar en la Figura 2, el ensayo demostró que la máxima señal analítica se ubicó a pH 2,0; estableciéndose como valor óptimo para la preparación de la solución amortiguadora. A lo largo del texto, este medio será designado como medio A.

##### Estudio de la longitud de excitación y emisión para la FUR

En este estudio se evaluó la influencia de dos parámetros de fundamental importancia en la fluorescencia molecular,  $\lambda_{\text{Exc.}}$  y  $\lambda_{\text{Emi.}}$ , sobre la señal analítica del estándar **S0**, preparado en el medio A. El procedimiento utilizado

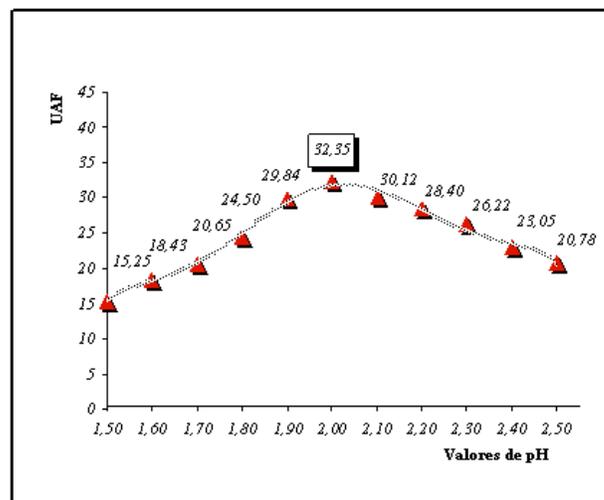


Figura 2: Estudio del valor de pH ideal para el medio A.

consistió en fijar inicialmente  $\lambda_{\text{Emi.}}$  en 400nm (valor de referencia)<sup>20</sup> y realizar -de forma manual- un barrido para  $\lambda_{\text{Exc.}}$  en el intervalo comprendido entre 250nm y 350nm, en intervalos de 2nm. Los resultados obtenidos, que se ilustran en la Figura 3, muestran que se obtuvo la máxima intensidad de fluorescencia corregida (blanco < 1 **AUF** en una escala arbitraria de 0 a 100) a 280nm. En segunda instancia, y fijando el parámetro optimizado, se evaluó el comportamiento  $\lambda_{\text{Emi.}}$  -Señal analítica-, empleando el procedimiento previamente descrito y realizando el barrido entre 350nm y 650nm, nuevamente en intervalos de 2nm. En esta experiencia, la máxima **UAF** corregida se observó a 410nm. Para ambos caso, se estableció para el paso óptico un ancho de rendija de 2nm. Sobre la base de estos resultados, se seleccionaron como longitudes de onda óptimas para el trabajo:  $\lambda_{\text{Exc.}} = 280\text{nm}$  y  $\lambda_{\text{Emi.}} = 410\text{nm}$ .

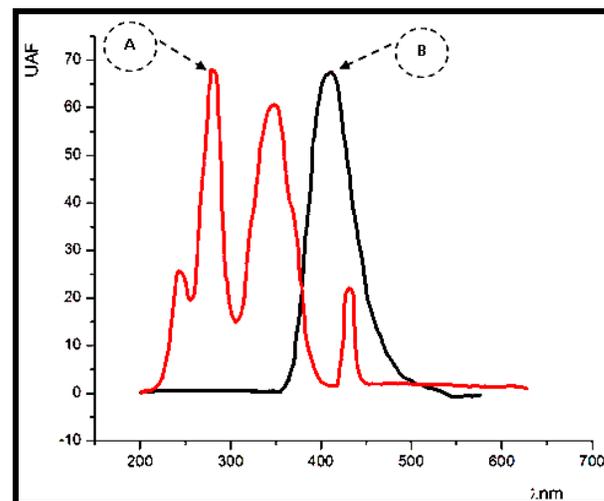


Figura 3: Espectros fluorescentes de la furosemina. (A) Espectro de excitación ( $\lambda_{\text{Exc.}} = 280\text{nm}$ ). (B) Espectro de emisión ( $\lambda_{\text{Emi.}} = 410\text{nm}$ ). En ambos casos se utilizó un estándar de **FUR** ( $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) preparada en el medio A.

### Efecto de la intercambiabilidad de la sal sobre la intensidad de la fluorescencia

En esta sección, se evaluó el efecto que tiene sobre la señal analítica la sustitución del cloruro de potasio del medio A por otra sal neutra como el cloruro de sodio. Para ello, se prepararon seis soluciones, sustituyendo parte del cloruro de potasio por la adición de 0,0; 1,16; 1,65; 2,02; 2,33 y 2,61 gramos de cloruro de sodio, respectivamente. En todas estas soluciones, se mantuvo el valor de la fuerza iónica constante en  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ , y la concentración del analito en el valor establecido como referencia (**S0**).

Como se puede observar en la Figura 4, no se observaron variaciones significativas en la señal analítica por efecto de la sustitución de la sal; proporcionando al sistema una respuesta robusta ante la intercambiabilidad de estas sales en la preparación del medio A. Estos resultados indican que la diferencia en los radios atómicos de los cationes ( $\text{Na}^+$ : 22,9898 *uma* y  $\text{K}^+$ : 39,0983 *uma*) presentes en las sales utilizadas en la preparación del medio A no afecta, de forma significativa la señal analítica.

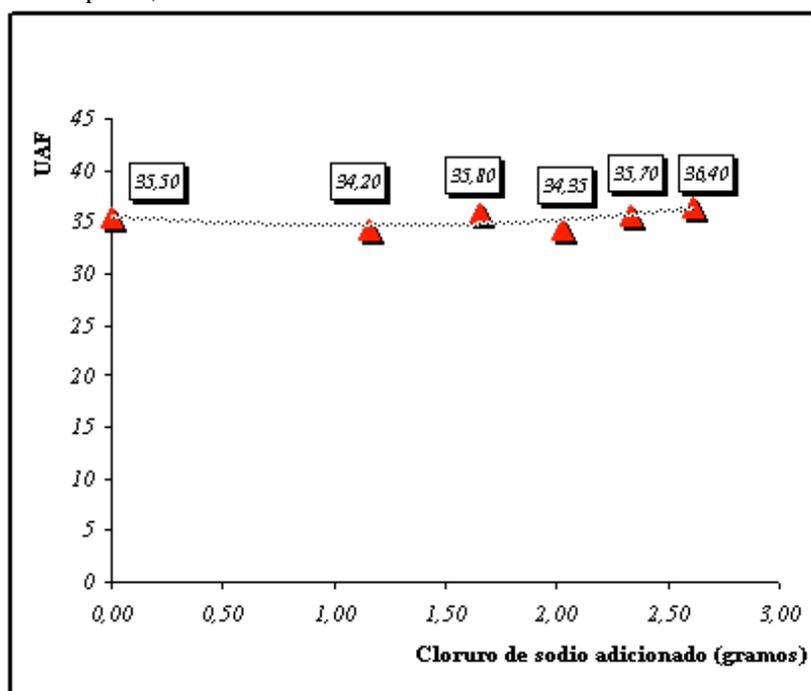
### Estudio de la robustez del sistema

La robustez de un método analítico se define como la medida de su capacidad para permanecer inalterado ante pequeñas, pero deliberadas, variaciones en ciertas variables experimentales del sistema. La robustez de un método se traduce en fiabilidad, especialmente cuando se emplea de forma rutinaria<sup>28</sup>. En el presente trabajo se realizó un diseño experimental tipo 3k, siendo las variables

seleccionadas para el estudio: pH, intercambiabilidad de la sal y temperatura. Estos parámetros se variaron a tres niveles, que denominaremos bajo, medio y alto. El pH del medio A se ajustó a 1,8; 2,0 y 2,2 unidades, el cloruro de potasio fue sustituido de forma parcial por la adición de 1,3; 1,5 y 1,7 gramos de cloruro de sodio y la temperatura de las soluciones -y del ambiente de trabajo- se fijó en 18, 20 y 22°C.

Las diversas combinaciones de los parámetros mencionados, en los niveles indicados, requieren un total de 27 soluciones de trabajo, en las que se mantuvo constante la concentración de **FUR** en el valor establecido como referencia (**S0**). La medida experimental de estas soluciones se realizó de forma aleatoria y los datos obtenidos fueron procesados utilizando el programa Stargraphics Plus<sup>29</sup> para generar el análisis de varianza (**ANDEVA**) y un gráfico de superficie con las variables en estudio.

El **ANDEVA**, que se presenta en la Tabla 1, compara inicialmente el efecto individual en función de la señal analítica de las variables (pH, intercambiabilidad de la sal y temperatura) y la influencia de las posibles asociaciones entre variables. En las experiencias realizadas, el valor estadístico Fischer (**F**) encontrado fue inferior al **F** tabulado (4,45), lo que indica la robustez del método propuesto.

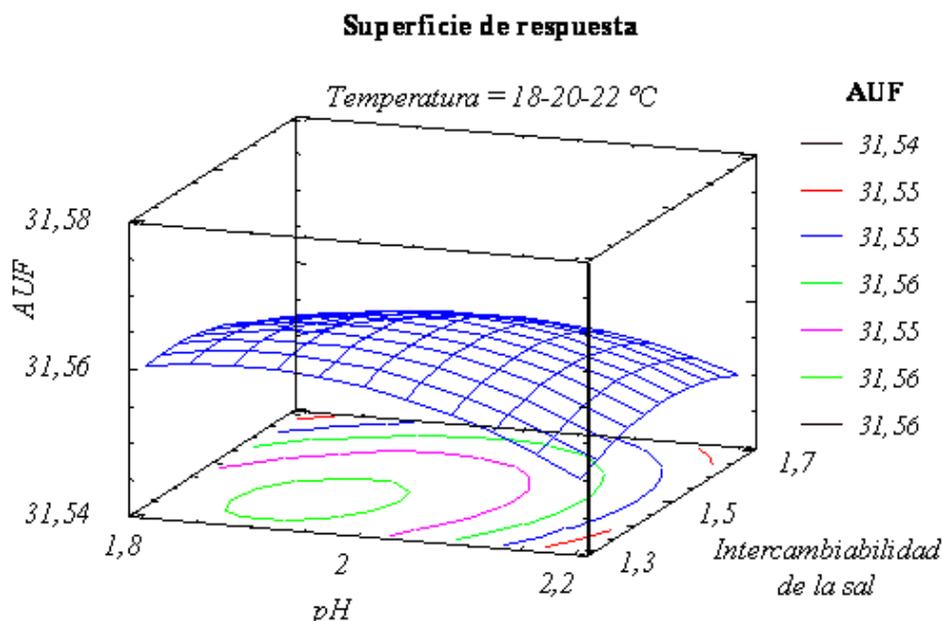


**Figura 4:** Estudio del efecto de la intercambiabilidad de la sal sobre la intensidad de la fluorescencia.

**Tabla 1:** ANDEVA para el diseño factorial.

Fuentes de variación	SC	GL	CM	F <sub>0</sub>	VP
pH	1,4 x 10 <sup>-4</sup>	1	1,4 x 10 <sup>-4</sup>	1,43	0,25
Fuerza iónica	8,8 x 10 <sup>-5</sup>	1	8,8 x 10 <sup>-5</sup>	0,92	0,35
Temperatura	2,2 x 10 <sup>-5</sup>	1	2,2 x 10 <sup>-5</sup>	0,23	0,64
Intervalo de pH	1,8 x 10 <sup>-4</sup>	1	1,8 x 10 <sup>-4</sup>	1,45	0,23
Efecto pH-fuerza iónica	7,5 x 10 <sup>-5</sup>	1	7,5 x 10 <sup>-5</sup>	0,77	0,39
Efecto pH-temperatura	2,0 x 10 <sup>-5</sup>	1	2,0 x 10 <sup>-5</sup>	1,95	0,20
Intervalo de concentración	6,6 x 10 <sup>-5</sup>	1	6,6 x 10 <sup>-5</sup>	0,69	0,42
Efecto fuerza iónica-temperatura	0,0	1	0,0	0,0	1,0
Intervalo de temperatura	2,6 x 10 <sup>-5</sup>	1	2,6 x 10 <sup>-5</sup>	1,85	0,19
Error	1,7 x 10 <sup>-3</sup>	17	1,6		
Total	2,6 x 10 <sup>-3</sup>	26			

SC: suma de cuadrados, GL: grado de libertad, CM: cuadrados medios, F<sub>0</sub>: estadístico de Fisher, VP: valor de la probabilidad.

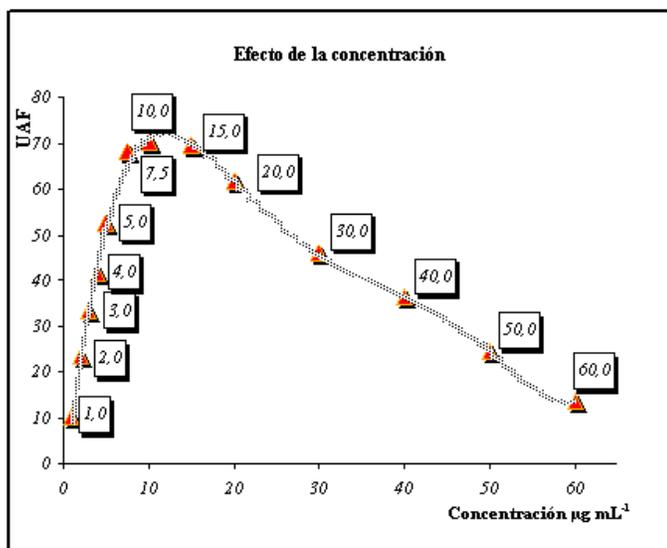
**Figura 5:** Superficie de repuesta para las variables: pH, intercambiabilidad de la sal y temperatura.

La Figura 5 ilustra la variación de la respuesta fluorescente con los parámetros evaluados, en el intervalo estudiado, así como la superficie de respuesta que se obtiene cuando se combinan las variables en estudio. Los valores óptimos para estos parámetros que se desprenden de este estudio, son: pH = 2,0; intercambiabilidad de la sal = 1,5 gramos de la sal cloruro de sodio y temperatura = 20°C.

#### Estudio de la concentración de la FUR en la intensidad de la señal fluorescente

El efecto que tiene la concentración del analito sobre la intensidad de fluorescencia se evaluó preparando

estándares de **FUR**, siempre en el medio A, de concentración creciente en el intervalo de 1,0 a 60,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Los resultados, que se presentan en la Figura 6, revelan proporcionalidad directa entre la señal analítica y la concentración del analito entre 1,0 y 7,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . En contraste, para concentraciones superiores se observa una disminución considerable en la señal. Este comportamiento es característico en los sistemas fluorescentes; y se debe a procesos de *auto-absorción* y *auto-extinción*<sup>30</sup>.



**Figura 6:** Estudio del efecto de la concentración sobre la señal analítica del analito.

#### Validación del método propuesto

Tras seleccionar las condiciones de trabajo y estudiar el comportamiento de la relación señal analítica-concentración, se establecieron las *Figuras de mérito* del método y se realizaron *estudios de precisión, de interferencias y de exactitud*. En este punto, el protocolo de validación se cerró, realizando análisis comparativos de muestras reales a través del método que se propone y el método oficial (CLAR-UV) que describe la USP.

#### Características analíticas del método (Figuras de mérito)

Bajo las condiciones de trabajo seleccionadas, la señal analítica mostró proporcionalidad directa con la concentración de **FUR** hasta un valor de  $22,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  ( $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). La ecuación de una curva de calibración típica, que incluye el blanco y seis estándares en el intervalo de  $1,51 \times 10^{-6}$  a  $15,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  ( $0,5$  a  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) es de  $I_F = 0,0312 + 0,0840 [\text{FUR}]$ , con un coeficiente de correlación ( $r$ ) de 0,9998 (ver secciones: *Estudio de la concentración de la FUR en la intensidad de la señal fluorescente* y *Estudios sobre "efecto matriz" y "exactitud"*). El límite de detección ( $3 \sigma$ ) fue  $4,84 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  ( $1,5 \text{ ng mL}^{-1}$ ), mientras que el límite de cuantificación ( $10 \sigma$ ) fue de  $1,45 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  ( $4,5 \text{ ng mL}^{-1}$ ). La frecuencia de medida del sistema propuesto es de, aproximadamente, 20 muestras  $\text{h}^{-1}$ .

#### Estudio de la precisión

La precisión del método se evaluó a través de la desviación estándar relativa (**DER**) correspondiente a las medidas de la intensidad de fluorescencia para un mismo día (intra-día) y diferentes días (entre-días) de cinco réplicas de patrones y soluciones-muestra de **FUR**. Los resultados que se presentan en la Tabla 2, muestran que la **DER** obtenida para las concentraciones estudiadas en un mismo día y entre días, fueron -en todos los casos- inferiores a 0,80%, y 1,02%, respectivamente. Estos valores cumplen con el intervalo de  $\pm 2,0\%$  que se considera como satisfactorio para este tipo de análisis<sup>31</sup>.

**Tabla 2:** Estudio de la precisión del método.

Matriz	Con	DER (%)	Matriz	Con	DER (%)
Furosemida (Intra-día)	0,5	0,65	Furosemida, (Entre-día)	0,5	0,56
	1,0	0,50		1,0	0,62
	2,0	0,68		2,0	0,73
	3,0	0,54		3,0	0,67
	4,0	0,66		4,0	0,88
Muestras (Comprimidos)	5,0	0,65	Muestras (Comprimidos)	5,0	0,72
	0,5	0,71		0,5	0,96
	1,0	0,77		1,0	0,87
	2,0	0,80		2,0	1,02
	3,0	0,63		3,0	0,93

Con: concentración en  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , DER (%): desviación estándar relativa, n= 5 determinaciones.

### Estudios sobre “efecto matriz” y “exactitud”

Inicialmente se evaluó la influencia que tienen, sobre la señal analítica de la **FUR**, los excipientes que suelen estar presentes en las formulaciones sólidas de este fármaco. Como referencia se utilizó la composición del producto **MD**, que reporta, por comprimido: **FUR** 40 mg, ludipress 194,12 mg, PVP K-30 2,68 mg, explotab 8,8 mg y talco 24 mg. Estos compuestos son insolubles en el medio en que se preparan las soluciones-muestra. Sin embargo, para corroborar la ausencia de efectos de matriz, se prepararon diversas soluciones a partir de c/u de los excipientes en forma aislada y de una mezcla de ellos, simulando la matriz. Esta serie se elaboró en ausencia y en presencia de **FUR**; y en su elaboración se siguió rigurosamente el protocolo descrito para la preparación de las soluciones-muestra. La concentración de **FUR** se fijó en el valor de referencia, mientras la cantidad de excipientes que se usó en su elaboración se estableció en base a la composición por cada comprimido. Bajo las condiciones de trabajo seleccionadas, no se encontró respuesta fluorescente por parte de los excipientes. De igual forma, no se observó -en ningún caso- una variación significativa en la señal analítica de la **FUR**.

Con relación a los compuestos relacionados A (ácido 2-cloro-4-N-furfurilamino-5-sulfamoilbenzoico) y B (ácido 4-cloro-5-sulfamoilantranílico) que se originan en la síntesis de la **FUR** (ver Introducción), y que pueden estar presentes en los comprimidos, afortunadamente solo presentan fluorescencia a pH superiores a 6,0.<sup>22,23</sup> Por esta razón, bajo las condiciones de trabajo seleccionadas (pH 2,0), no interfieren en la determinación de **FUR**.

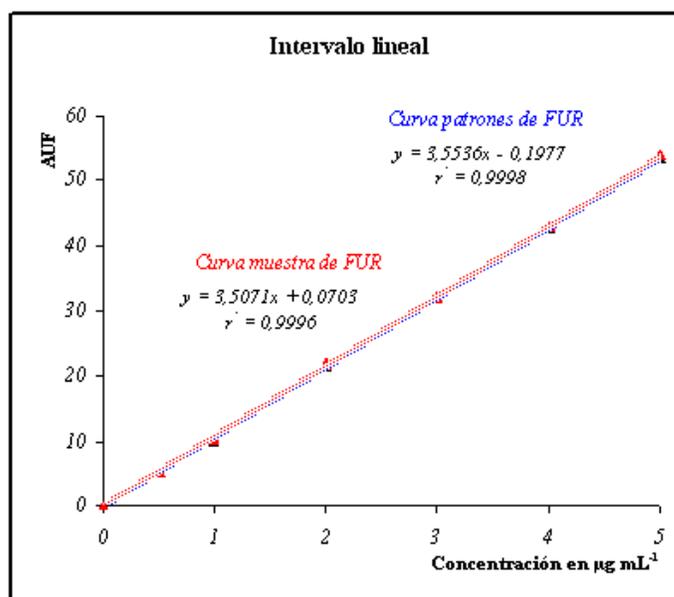
En una segunda etapa, se estableció una comparación entre curvas de calibrado (**CCS**) simples, preparadas a partir del patrón de **FUR** y de una solución muestra del analito -preparada a partir del producto **MA**- con una concentración nominal de **FUR** equivalente al patrón. Ambas curvas se construyeron a partir del blanco y seis soluciones de trabajo, (0,5 a 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), preparados en el medio A; y en todos los casos las lecturas fueron realizadas por quintuplicado.

La comparación de las pendientes de ambas curvas (ver Figura 7) no mostró diferencias significativas (*t-student* 95% < 2,57, n= 7). Estos resultados indican, en principio, la ausencia de interferencias de tipo físico y químico en la muestra estudiada.

A continuación, se realizaron con las diferentes muestras comerciales **MA**, **MB**, **MC** y **MD** curvas de adición de estándar (**CAE**) en la modalidad clásica (volumen de muestra constante, volumen de estándar variable y volumen final constante).<sup>32</sup> Para ello se fijó en 5 mL el volumen de las diferentes soluciones-muestra, preparadas

a una concentración de 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y se adicionaron cantidades variables del patrón de **FUR** en el rango de 0 a 3,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Todas estas soluciones fueron preparadas en el medio A, en un volumen final de 10 mL.

Como se puede observar en la Tabla 3, la comparación de las pendientes de las curvas elaboradas a partir de los patrones (**CCS**) y soluciones-muestra enriquecidas con el patrón de **FUR** (**CAE**) no muestra diferencias significativas (*t-student* 95% < 2,57, n= 7). Estos resultados ratifican la ausencia de interferencias físicas y químicas por parte de la matriz de esas muestras.



**Figura 7:** Comparación de las curvas de calibrado de estándar y muestra (MA).

**Tabla 3:** Curvas de adición estándar.

Muestra	Ecuación de la recta $I_F = a + b$ [FUR]
<b>CCS</b> Patrones	$I_F = 0,0312 + 0,0840$ [FUR]
<b>MA</b> CAE <sub>(MA)</sub>	$I_F = 0,4995 + 0,0824$ [FUR]
<b>MB</b> CAE <sub>(MB)</sub>	$I_F = 0,4968 + 0,0814$ [FUR]
<b>MC</b> CAE <sub>(MC)</sub>	$I_F = 0,5078 + 0,0822$ [FUR]
<b>MD</b> CAE <sub>(MD)</sub>	$I_F = 0,5085 + 0,0838$ [FUR]

**CCS:** Curva de calibración simple con patrón de **FUR** (blanco y seis estándares), **CAE (MA, MB, MC y MD):** la preparación de las soluciones utilizadas en las cuatro experiencias de adición de estándar (muestra y cuatro soluciones de muestra fortalecidas con el patrón) se describe en detalle en el texto,  $I_F = a + b$  [FUR]: ecuación de la recta (**CCS** y **CAE**), n = 5 determinaciones.

Por último, los *sets* de calibración utilizados en las experiencias de **CAE** fueron usados para realizar una estimación preliminar de la exactitud del método, a través

de estudios de recuperación. En las muestras estudiadas, el porcentaje de recuperación obtenido osciló entre 99,8% y 101,20%, valores todos que pueden ser considerados como satisfactorios, especialmente si se toma en cuenta el intervalo de tolerancia que permite la USP 29 para la cuantificación de la **FUR** en formas farmacéuticas sólidas (90,0% a 110,0%).<sup>7</sup>

Estos resultados evidencian la exactitud del método, la correcta aplicación del mismo y la ausencia de errores sistemáticos a lo largo de todo el procedimiento desarrollado. Además, avalan el uso de la **CCS** a partir de estándares de **FUR** para realizar el análisis.

#### Comparación con un método de referencia validado

Este estudio consistió en comparar, a través de las correspondientes pruebas estadísticas, los resultados obtenidos mediante el método propuesto por fluorescencia y el método oficial de referencia CLAR-UV (USP 29). Para los análisis realizados por fluorescencia, se prepararon seis soluciones de las muestras de **FUR** con una concentración de  $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  preparadas en el medio

A. Además, se prepararon seis soluciones de las mismas muestras de **FUR** siguiendo el protocolo descrito por la USP para la determinación del fármaco en forma farmacéutica sólida. La Tabla 4 contrasta los resultados obtenidos para ambos métodos utilizando el test de Fisher y *t-student*. El análisis estadístico demostró, con un 95% de confianza, que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos por ambos métodos<sup>32</sup>.

#### Análisis de muestras reales

El método validado se aplicó satisfactoriamente para la determinación del contenido de **FUR** en cuatro muestras comercializadas en nuestro país, innovador y genéricos, que declaran contener 40 miligramos por cada comprimido. Los resultados que se presentan en la Tabla 5, muestran una buena concordancia con el valor nominal declarado en los mismos. Además, todas las muestras analizadas se encuentran dentro del rango establecido por la USP 29 para la cuantificación de la **FUR** en formas farmacéuticas sólidas.

**Tabla 4.** Contraste entre el método propuesto y el método por CLAR-UV (oficial).

Analito	Método	CE	X	S <sup>2</sup>	Prueba F	Prueba t
Furosemida	Propuesto (fluorescencia)	39,60	39,91	0,49	F <sub>enc</sub> 0,0026	F <sub>enc</sub> 0,2983
		39,34				
		39,74				
		39,44				
		41,22				
		40,14				
	USP (CLAR)	39,82	39,75	0,13	F <sub>tab</sub> 5,05	F <sub>tab</sub> 2,23
		39,68				
		39,76				
		39,65				
		39,98				
		39,61				

CE: concentración encontrada por cada comprimido, X: promedio, S<sup>2</sup>: varianza. Prueba F: prueba de Fisher, Prueba t: prueba de *t-student*.

**Tabla 5.** Análisis del producto innovador utilizando el protocolo analítico.

Analito	Producto	CD	CE	DER (%)
Furosemida	MA (innovador)	40	39,91	0,25
	MB (genérico)		38,80	0,51
	MC (genérico)		39,25	0,35
	MD (genérico)		40,25	0,48

CD: cantidad declarada en miligramos por comprimido, CE: concentración promedio encontrada por cada comprimido, DER (%): desviación estándar relativa promedio, n= 5 determinaciones.

## Conclusiones

Se desarrolló y validó un nuevo método analítico para la determinación de **FUR** en formulaciones farmacéuticas sólidas, que se basa en la fluorescencia nativa que presenta la molécula en solución amortiguadora de pH 2,0. Esta condición permitió llevar a cabo un análisis simple y directo, que no requiere de etapas previas de extracción ni reacciones de derivatización. La propuesta metodológica que se describe presenta claras ventajas frente al método oficial por CLAR-UV, descrito en la USP, en aspectos como: simplicidad, costo de análisis, frecuencia de análisis (20 muestras h<sup>-1</sup>), bajo consumo de solventes orgánicos y mínima generación de desechos.

Por otra parte, como consecuencia de la sensibilidad que ofrece la fluorescencia molecular, el límite de detección de 1,5 ng L<sup>-1</sup> que proporciona el método, permitirá su aplicación en la determinación y cuantificación de trazas de **FUR**, posterior al proceso de limpieza de las maquinarias y áreas de fabricación.

**Nota:** El desarrollo de este trabajo fue co-financiado por el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) a través del Proyecto G-2005000641.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Laboratorio de Análisis de Medicamentos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (ULA-Mérida) por la colaboración prestada durante el desarrollo del presente trabajo.

## Referencias bibliográficas

1. C Schneider, M Bojaca. Vademécum farmacología. Bogotá (Colombia): Editorial Inter. BCA SA. (2004).
2. J Hardman, L Limbird. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 10 ed. DF, (México) Editorial Interamericana; (2003).
3. US. Food Drug and Administration (FDA). **Drugs**. [artículo en línea]. Consulta: 10 de enero de 2009 en: <http://www.fda.gov/downloads/Training/ForHealthProfessionals/UCM090796.pdf>
4. L Ponto, R Schoenwald. Furosemide: pharmacokinetics /pharmacodynamics review. **Clin. Pharmacokinet.**, **18**, 461–471 (1990)
5. A Spilva de Lehr, M Spilva. Guía spilva de las especialidades farmacéuticas. 26 ed. Caracas (Venezuela): Editorial Global. S.A. (2000).
6. C Moffat. Clarke's isolation and identification of drugs. 3 ed. London (Inglaterra). Editorial Pharmaceutical Press (2005).
7. The United States Pharmacopeia, **USP-29**. The National Formulary 24. The United States Pharmacopeia Convention. INC. Rockville, United States of America (2008).
8. S Kulichenko, G Shevchenko. Triton X-100-stabilized "oil-in-water" emulsions as suitable media for alkalimetric determination of hydrophobic organic acids. **Anal. Bioanal. Chem.**, **375**, 255–258 (2003).
9. S Kulichenko, S Fesenko. Titrimetric determination of furosemide using aqueous-micellar solutions of surfactants. **J. Anal. Chem.**, **57**, 231–234 (2002).
10. R Stefan, G Baiulescu, H Aboulenein. Ion-selective membrane electrodes in pharmaceutical analysis. **Crit. Rev. Anal. Chem.**, **27(4)**, 307-321 (1997).
11. V Cosofret, P Buck. Recent advances in pharmaceutical analysis with potentiometric membrane sensors. **Crit. Rev. Anal. Chem.**, **24(1)**, 1-58 (1993).
12. J Millership, C Parker, D Donnelly. Ratio spectra derivative spectrophotometry for the determination of furosemide and spironolactone in a capsule formulation. **II Farmaco**, **60**, 333–338 (2005).
13. A Sevillano-Cabeza, P Campins-Falco, M Serrador-Garcia. Extractive-spectrophotometric determination of furosemide with sodium 1,2-napthoquinone-4-sulfonate in pharmaceutical formulations. **Anal. Lett.**, **30(1)**, 91-107 (1997).
14. A Golcu. Spectrophotometric determination of furosemide in pharmaceutical dosage forms using complex formation with Cu (II). **J. Anal. Chem.**, **61(8)**, 748-754 (2006).
15. S Silva, R De-Sousa, G Tadeu. Flow injection spectrophotometric determination of furosemide in pharmaceuticals by the bleaching of a permanganate carrier solution. **J. Flow. Inj. Anal.**; **22**, 34-37 (2005).
16. M Gotardo, A Gigante, L Pezza, H Pezza. Determination of furosemide in pharmaceutical formulations by diffuse reflectance spectroscopy. **Talanta**, **64**, 361–365 (2004).
17. M Galignani, R Rondón, D Ovalles, C Ayala C, M Brunetto M. Determinación de furosemida en productos farmacéuticos (tabletas) por espectrometría infrarroja con transformada de fourier (FTIR). IX Congreso Venezolano de Química, Julio 01 al 05 2009; [Libro de Resúmenes]. Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná.
18. A Guzmán, L Aguí, M Pedrero, P Yáñez-Sedenó, J Pingarrón. Flow injection and HPLC determination of furosemide using pulsed amperometric detection at micro-electrodes. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, **33**, 923–933 (2003).
19. S Carda-Broch, J Esteve-Romero, M García-Alvarez-Coque. Furosemide assay in pharmaceuticals by micellar liquid chromatography: Study of the stability of the drug. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, **23**, 803–817 (2000).
20. R Ventura, J Segura. Detection of diuretic agents in doping control. **J. Chromatogr. B.**, **687**, 127–144 (1996).
21. N Arnaud, J Georges. Investigation of the luminescent properties of terbium-anthranilate complexes and application to the determination of anthranilic acid derivatives in aqueous solutions. **Anal. Chim. Acta.**, **476**, 149–157 (2003).

22. P Ioannou, V Rusakova, D Andrikopoulou, K Glynoua, G Tzompanaki. Spectrofluorimetric determination of anthranilic acid derivatives based on terbium sensitized fluorescence. **Analyst**, **123**, 2839-2843 (1998).
23. W Forrey, B Kimpel, A Blair, R Cutler. Furosemide concentrations in serum and urine, and its binding by serum proteins as measured fluorometrically. **Clin. Chem.**, **20**, 152-158 (1974).
24. E Llorent-Martínez, P Ortega-Barrales, A Molina-Díaz. Multicommuted flow-through fluorescence optosensor for determination of furosemide and triamterene. **Anal. Bioanal. Chem.**, **383**, 797-803 (2005).
25. F Semaan, P Nogueira, E Cavalheiro. Flow-based fluorimetric determination of furosemide in pharmaceutical formulations and biological samples: Use of micelar media to improve sensitivity. **Anal. Lett.**, **41**, 66-79 (2008).
26. K Rubinson, J Rubinson. Análisis instrumental. Madrid (España): Pearson Educación S.A. (2004).
27. N Maniasso. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, **24(1)**, 87-93 (2001).
28. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Validation of analytical procedures: text and methodology. [artículo en línea]. Consulta: 15 de enero del 2009 en: <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>.
29. Stargraphics plus versión 5.1 [software]. Warrenton, VA 20186 USA: StatPoint Technologies Inc (2001).
30. Tissue Optical Spectroscopy Laboratory. Fluorescence spectroscopy in vivo. [artículo en línea]. Consulta: 12 de febrero del 2009 en: <http://nimmi.bme.duke.edu/Publications/ramanujam-eac-2000.pdf>.
31. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (A.E.F.I). Validación de métodos analíticos. Barcelona, España (2001).
32. JN Miller, JC Miller. Estadística y quimiometría para química analítica. 4 ed. Madrid (España); Editorial Pearson Educación (2005).