

ANÁLISIS DE DATOS EN ENSAYOS ACELERADOS NO ISOTÉRMICOS

Marta Hidalgo, C. Angélica Álvarez, Alexis Oliva, Matías Llabrés y José B. Fariña

Dpto. Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia,
Universidad de La Laguna, 38200 La Laguna, Tenerife, España

Resumen

En este trabajo se llevó a cabo el análisis de los datos en los ensayos acelerados isotérmicos mediante los métodos de la derivada y de la integral. Los parámetros estimados de la energía de activación y del factor de frecuencia por ambos métodos proporcionan resultados similares siendo la diferencia en el plazo de validez estimado a 25°C inferior al 2,15%.

Introducción

La mayor parte de los ensayos de estabilidad se basan en la metodología clásica aplicando las ecuaciones de Arrhenius o de Eyring. Los ensayos acelerados isotérmicos permiten adelantar información sobre la estabilidad de los fármacos, pero el número de muestras a analizar, el tiempo de análisis requerido y la validez de la extrapolación a T^a ambiente pueden cuestionar dicha ventaja. Los ensayos no isotérmicos constituyen una alternativa a los ensayos isotérmicos ya que reducen la cantidad de producto, el número de experimentos y el tiempo de análisis [1]. Sin embargo, los ensayos no isotérmicos presentan la limitación de que la degradación debe producirse en una fase homogénea, el programa experimental de cálculo para determinar la energía de activación E_a y el factor de frecuencia, A, tiene que estar previamente definido, y la degradación del producto debe ser total. Uno de los problemas que presentan los ensayos no isotérmicos es el análisis de los datos, dado que los valores estimados, E_a y

A, tienen gran trascendencia a la hora de estimar el plazo de validez (t_{10%}). Por ello, el objetivo del presente trabajo se centró en la viabilidad de dos métodos utilizados habitualmente en el análisis de los datos en condiciones no isotérmicas, el denominado de la derivada y el método de la integral. En este estudio se utilizó el fragmento 26-33 de la colecistoquinina (CCK-8) como molécula modelo.

Materiales y Métodos

Materiales

Se utilizó el fragmento 26-33 de la colecistoquinina (CCK-8) suministrada por Sigma (lotes: 45H38333 y 062K09561). Todos los reactivos fueron de grado analítico.

Método analítico

Se utilizó un cromatógrafo Waters, con una columna Nova Pack C-18, y un detector UV-Vis a una longitud de onda de 280 nm, como procesador de datos se utilizó el programa Millennium3.2[®]. La fase móvil fue una mezcla acetonitrilo/agua (30:70) con un 0,05% de trifluoroacético a un flujo de 1ml/min. El método analítico fue validado siguiendo las normas de la Guía ICH [2].

Ensayos acelerados no isotérmicos

Para el control de las temperaturas se utilizó una estufa Heraeus (Modelo BR6000) que permite controlar la temperatura a través de una interfase RS232. Para la variación de la temperatura y la adquisición de los datos de la variación de ésta con el tiempo, se utilizó el programa TestTPoint[®] 4.0, que permita entre otras funciones, el incremento lineal

de la temperatura con el tiempo. Así, la temperatura inicial fue de 40°C y la final de 88°C, con una velocidad media de calentamiento de 0,252°C/h.

Tratamiento de las muestras

La CCK-8 se disolvió con dimetilsulfóxido en una disolución con NaOH 0,01M para obtener una concentración de 0,1 mg/ml. Cada 12 horas se tomaron 50 µl de muestra y se diluyeron convenientemente con fase móvil para su análisis cromatográfico. Las muestras se analizaron por triplicado.

Análisis de datos

Asumiendo que la degradación de un fármaco viene dada por:

$$-(dC/dt)_i = kC_i^v \quad \text{Ec.1}$$

donde C es la concentración a tiempo t, k la constante de velocidad de degradación observada y v el orden de reacción. Si sustituimos la k, de la ecuación 1 por la ecuación de Arrhenius,

$$k = A \cdot e^{-E_a/RT} \quad \text{Ec. 2}$$

donde A es el factor de frecuencia, E_a la energía de activación, R la constante universal de los gases y T la temperatura absoluta se obtiene la siguiente ecuación:

$$-(dC/C_i) = A \exp[-E_a/RT(t)] dt \quad \text{Ec. 3}$$

La solución matemática de esta ecuación depende de la relación entre el tiempo y la temperatura. Así, el caso más simple es la variación lineal de la temperatura con el tiempo,

$$T_t = T_0 + v \cdot t \quad \text{Ec. 4}$$

donde v es la velocidad de calentamiento y T₀ y T_t son la temperatura inicial y a tiempo t respectivamente.

Para la resolución de la ecuación 3 se puede recurrir al Método de la Derivada y al método de la Integral. En el primer caso seguimos el modelo propuesto por Waltersson y Lungred [3] donde la variación de la concentración con el tiempo se ajusta a un polinomio de grado "n":

$$C(t) = a_0 + a_1 t + a_2 t^2 + a_3 t^3 + \dots + a_n t^n \quad \text{Ec. 5}$$

A partir de la derivada de este polinomio se puede estimar la constante de degradación a distintos tiempos;

$$C'(t) = a_1 + 2a_2 t + 3a_3 t^2 + \dots + na_n t^{n-1} \quad \text{Ec. 6}$$

Conociendo la relación entre la temperatura y el tiempo podemos conocer la constante de velocidad a una determinada temperatura; haciendo uso de la ecuación de Arrhenius podemos estimar la E_a y el A y por lo tanto el plazo de validez.

En cuanto al método de la Integral, consiste en la resolución de la ecuación 3 en su forma integrada por regresión no lineal,

$$[C] = [C]_0 \exp(-At) \quad \text{Ec. 7}$$

$$I = \int \exp\left[\frac{-E_a}{R \cdot G(t)}\right] dt \quad \text{Ec. 8}$$

Para ello, se recurre a la función "NonLinearFit" del programa Matemática[®] [4] de tal forma que el programa proporciona los valores estimados de E_a y A de forma que la suma de cuadrados de los residuales sea mínima.

Resultados y Discusión

En el método de la derivada, la variación de la concentración de CCK-8 con el tiempo (Figura 1) se ajustó a un polinomio de grado "n" considerando una cinética de orden cero, uno y dos.

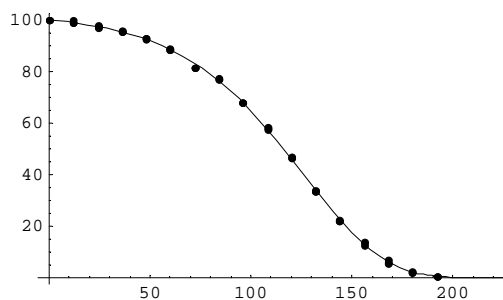


Figura 1. Variación del porcentaje remanente de la concentración de CCK-8 frente al tiempo en condiciones no isotérmicas a una velocidad de calentamiento de 0,25°C/h.

El número de términos del polinomio varió entre 4 y 7; si aplicamos el criterio establecido por Kipp [5], el polinomio que mejor se ajusta es el de grado 5 considerando una cinética de orden uno ya que el coeficiente de correlación de la representación de Arrhenius fue de 0,995, siendo la suma de los cuadrados de los residuales mínima.

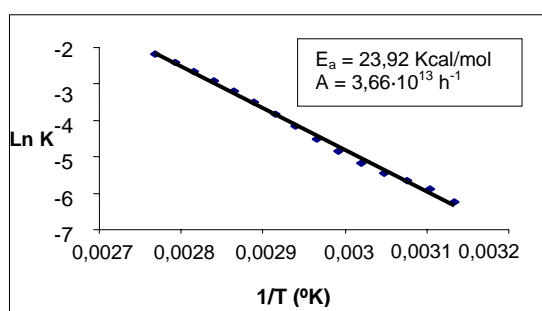


Figura 2. Representación de Arrhenius obtenida en el ensayo no-isotérmico aplicando el método de la derivada, considerando un polinomio de grado 5 y una cinética de primer orden.

A partir la representación de Arrhenius se estimó la energía de activación y el factor de frecuencia, obteniéndose valores de 23,92 Kcal/mol y de $3,66 \cdot 10^{13} \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Con estos datos y para una temperatura de 25°C obtenemos un plazo de validez, $t_{10\%}$, de 40,9 días, mientras que para una temperatura de 5 °C, el plazo de validez fue de 2,04 años. En el método de la Integral el programa Matemática® resuelve de forma directa la integral d la ecuación 8 para cada tiempo, estimándose la E_a , A y la concentración inicial, C_o , por regresión no lineal [6], datos recogidos en la tabla 1.

Parámetro	Valor±I.C. 95%
Ln A	31,5 [30,8-32,1]
E_a (Kcal/mol)	24,1 [23,7-24,5]
C_o (%)	100 [99,9-101]

Tabla 1. Valores estimados e intervalos de confianza del 95%, de los parámetros del ensayo no isotérmico

La constante de velocidad de degradación a 25°C fue de $1,05 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$, mientras que a 5°C, se obtuvo un valor de $5,67 \cdot 10^{-6} \text{ h}^{-1}$, fue de 41,8 días para una temperatura de 25°C,

mientras que a 5°C el plazo de validez fue de 2,12 años.

En la tabla 2 se comparan los plazos de validez obtenidos por los dos métodos de análisis utilizados en condiciones no isotérmicos.

	M.Derivada	M. Integral	Error %
E_a (Kcal/mol)	23,9	24,1	0,58
A (h^{-1})	$3,66 \cdot 10^{13}$	$4,56 \cdot 10^{13}$	19,7
$t_{10\%}$ 25°C	40,9 días	41,8 días	2,15
$t_{10\%}$ 5°C	2,04 años	2,12 años	3,77

Tabla 2. Valores de la E_a , A y del plazo de validez estimados en condiciones no isotérmicos para los dos métodos de análisis utilizados.

La diferencia entre los valores de la E_a estimados por ambos métodos fue menor del 0,6 %, mientras que en el caso del factor de frecuencia el error se elevó al 19,7%, resultado nada sorprendente dado que en el método de la derivada, el factor de frecuencia se calcula a partir de la ordenada en el origen de la representación de Arrhenius, de forma que pequeñas variaciones en la pendiente afectan considerablemente a la ordenada.

Como puede observarse el error de la estimación del plazo de validez para una temperatura de 25°C fue del 2,15%, lo que representa una diferencia de menos de 1 día, mientras que este porcentaje se elevó hasta un 3,8 % si la temperatura es de 5°C. Estos resultados ponen de manifiesto que no existen a priori diferencias significativas entre ambos métodos de análisis.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Gobierno de Canarias (Proyecto 072/2001).

Bibliografía

- Mu-Lan Lee, S. Stavchansky, Isothermal and Nonisothermal decomposition of thymopentin and its analogs in aqueous solution, *Pharm. Res.*, 15, 1702 (1998).
- International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Methodology (ICH-Q2B), November, 1996.

3. Waltersson, J.O. and Lundgren, P., Non-Isothermal Kinetics applied to pharmaceuticals, *Acta Pharm. Suec.*, 19 (1982) 127-136.
4. Mathematica: A system for doing Mathematics by computer. Addison-Wesley, Redwood City, CA, 1988.
5. James E, Kipp, Nonisothermal Kinetics-comparasion two methods of data treatment, *Int. J. Pharm.* 26 (1985) 339-354.
6. Oliva, A. Álvarez, C.A., Hidalgo, M., Fariña, J.B. y Llabrés, M. Congreso SEFIG, 141, Granada, 2003.

Autor de contacto:

Nombre y apellidos: Marta Hidalgo Soriano

e-mail: mhidalgo@emmasa.es

Institución: Dpto. Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica, Facultad Farmacia, Universidad de La Laguna

Dirección: Avda. Francisco Sánchez s/n 38200

Ciudad: La Laguna, Tenerife

Tel.: 922318452

Fax: 922318506