

Aceptada para su publicación en la REVISTA MEXICANA DE CIENCIAS FARMACEUTICAS (AFM) el 18-08-2003

1. Título en español: CUANTIFICACION DE DERIVADOS IMIDAZOLICOS CON COMPLEJOS DE COBALTO(II) EN CREMAS

Título en inglés: A QUANTITATIVE METHODOLOGY FOR DETERMINATION OF IMIDAZOLIC COMPOUNDS IN CREAMS, UTILIZING A COBALT COMPLEX(II) ASSAY

Clasificación: trabajo científico

Nombre del autor: HEINZ WALTER LIECHTI

Nombre del autor responsable y Correspondencia: HEINZ W. LIECHTI, Correo Centro Comercial, AP C-53, Managua, Nicaragua, Teléfono: +505-277-3553, e-mail: heinz@cablenet.com.ni

Químico y Farmacólogo. Suizo residente en Nicaragua. Miembro de la Swiss & American Chemical Society, New York Academy of Sciences y Asociación Farmacéutica Mexicana, Who's Who Historical Society.

2. Resumen en español:

Resumen

Los antimicóticos imidazólicos, como clotrimazol y ketoconazol tienen un amplio uso farmacéutico, sobre todo en presentaciones tópicas como cremas. Las farmacopeas USP XXV y BP 2001 no describen un método para ketoconazol crema, mientras ambas presentan un método HPLC para clotrimazol.

Este trabajo presenta un método, basándose en la formación de un complejo celeste-agua entre cobalto(II) y la parte imidazólica de los fungicidas, el cual es cuantificado por espectroscopia visible. Es un método adecuado para la cuantificación del principio activo del producto en proceso, aunque no lo es para ensayos de estabilidad. Se explican brevemente los conceptos teóricos del método y la metodología detallada para la cuantificación de clotrimazol y ketoconazol en crema.

PALABRAS CLAVE: cuantificación espectroscópica, antimicóticos imidazólicos, clotrimazol, ketoconazol, complejo de cobalto(II)

3. Resumen en inglés:

Summary

Imidazole antimycotics are widely used mainly in topical drug formulations, for manufacture of pharmaceutical creams such as clotrimazole and ketoconazole. USP XXV and BP 2001 pharmacopoeias describe HPLC assays for clotrimazole while a method for ketoconazole cream is not included.

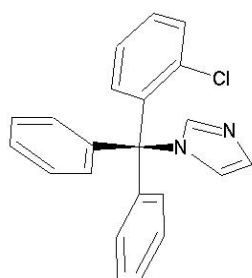
A method has been established based upon a aquamarine complex formed by the reaction of cobalt(II) and the imidazole side chain of these fungicides, which can be quantified via visible spectroscopy. This assay does provide a reliable quantification of the active ingredient for in-process control, even though it does not apply for stability testing. The theoretical concepts of

the method are highlighted and the detailed methodologies for quantification of clotrimazole and ketoconazole in pharmaceutical creams are given.

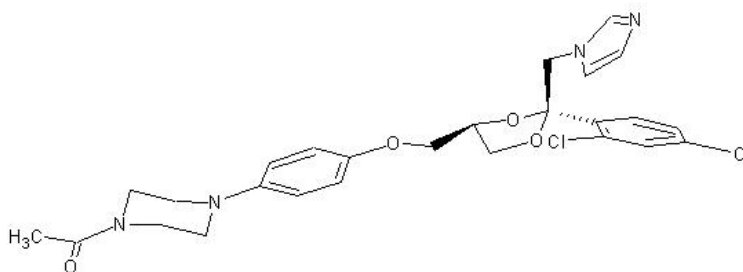
KEYWORDS: spectroscopic quantification, imidazole antimycotics, clotrimazole, ketoconazole, cobalto(II) complex

4. Introducción

Los antimicóticos imidazólicos, como clotrimazol y ketoconazol son bases orgánicas débiles, con un fuerte impedimento estérico para la función básica y que posee como en el caso de clotrimazol tres grupos fenilo que la convierten en una sustancia muy lipofílica (1).



Clotrimazol



Ketoconazol

Muchas de las formulaciones galénicas que se encuentran en el mercado, contienen además del principio activo, aceites esenciales, preservantes como parabenos, grasas y emulsificantes, normalmente en un medio polar acuoso o parcialmente no acuoso con propilenglicol y etanol (2).

La valoración cuantitativa en productos terminados de diferentes presentaciones farmacéuticas, tanto de clotrimazol como de ketoconazol es según las farmacopeas USP XXV y BP 2001 normalmente por HPLC (3,4).

Métodos basados en extracción doble presentan inconvenientes en la recuperación del activo, sobre todo en presencia de altas concentraciones de componentes grasos y un método volumétrico con laurilsulfato de sodio como titulante, descrito para clotrimazol en la USP XX, el cual se aplica en el caso de la crema, requiere bastante tiempo y es delicado en la detección del punto de viraje (5).

El método presentado se basa en la formación de un complejo de color celeste-agua, entre cobalto (II) y la parte imidazólica de los fungicidas, el cual es cuantificado por espectroscopia visible, apto sobre todo para cuantificaciones durante el control en proceso (6).

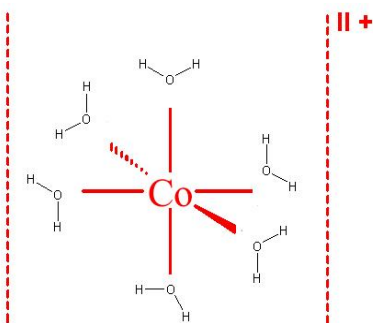
Cobalto en su estado de oxidación 2+(II), como p.ej. en $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, tiene 7 d-electrones, los cuales determinan su comportamiento químico. El cobalto(II) forma complejos iónicos con diferentes ligandos, mayoritariamente con una coordinación octaédrica o tetraédrica. Como ligandos pueden fungir por ejemplo agua, cloruro o como en este método, la sub-estructura imidazólica de clotrimazol o ketoconazol (6,7,8).

Para ningún otro metal de transición, la diferencia en la estabilidad de complejos octaédricos y tetraédricos, es tan pequeña como en el caso de cobalto(II). Incluso existe un equilibrio entre las dos estructuras geométricas del complejo, por ejemplo para agua como ligando:

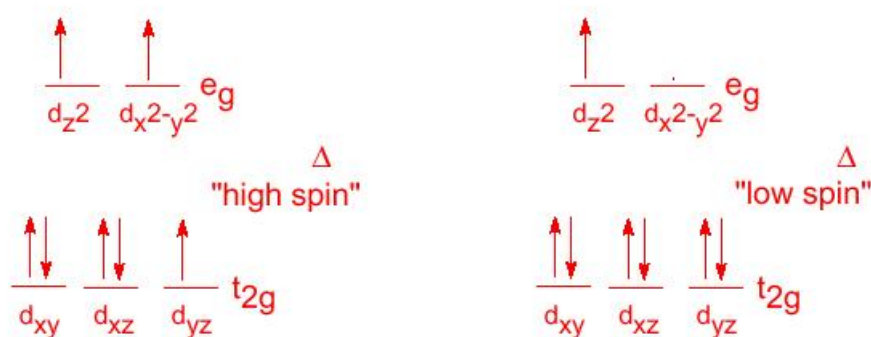


El color de estos complejos cambia con la coordinación y el tipo del solvente: Los complejos octaédricos son de color rosado. Los complejos tetraédricos son de color azul (6).

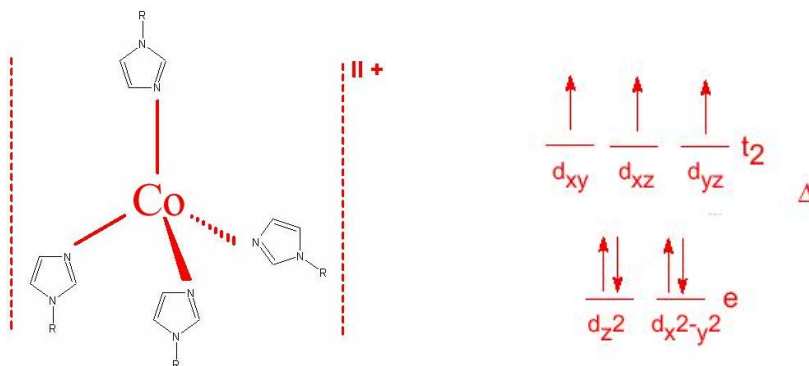
Complejo hexa agua de Co(II) en agua:



En solventes polares anhidros, estos dos tipos de complejos están caracterizados según el tipo de ligando. Las características espectroscópicas, magnéticas y de color son dadas por los d-electrones del orbital molecular (OM) del complejo. El complejo octaédrico de $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ tiene la siguiente estructura y distribución electrónica para los d-orbitales:



Se presenta en el eje Y las diferencias de energía del “crystal field splitting” en “high” y “low spin” complejos y su configuración electrónica con el grupo de simetría de los niveles energéticos en el OM. En el caso del cobalto (II), la separación de los niveles energéticos de los d-orbitales es pequeña, comparada con complejos de otros metales (p.ej. Ni, Fe) y la diferencia en la energía entre el complejo octaédrico y el tetraédrico también. El complejo del tipo “high-spin” es con agua octaédrico $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ y con ligandos más fuertes como es el anillo imidazólico de clotrimazol o ketoconazol, la coordinación cambia a tetraédrica (6,7,8):



5. Material y métodos

Materiales y Reactivos

Todos los reactivos (Cloroformo, Acetona, Cloruro de Cobalto(II) Hexahidratado [300 mg $\text{CoCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ en 10 mL de Acetona]) fueron de grado analítico (Merck; Alemania). Etanol y Propilenglicol fueron de grado USP XXV.

Instrumental

El espectrofotómetro UV-VIS es de marca Hitachi 150-20. La cristalería calibrada de tipo A de marca Pyrex.

Metodología analítica

El punto de partida del desarrollo de la metodología analítica fue el desarrollo de un sistema de solventes que permitiera la selectividad coordinativa del complejo de cobalto(II) con la parte imidazólica aún en presencia de excipientes. Durante el desarrollo se usaron diferentes disolventes polares y sus mezclas, hasta obtener una mezcla que permitiera alcanzar 3 objetivos: 1) selectividad para el complejo tetraédrico, 2) robustez ante diferentes formulas galénicas como son las partes grasos (variación de $\pm 20\%$), emulsificantes (variación de $\pm 20\%$) y contenido de agua (variación de $\pm 30\%$) de la crema y 3) estabilidad del complejo formado durante el tiempo necesario para su cuantificación (<1 hora). La mezcla óptima encontrada de disolventes para ketoconazol y clotrimazol consiste en 10 mL de cloroformo (81.3% v/v), 2 mL de etanol (16.3% v/v) y 0.3 mL de acetona (2.4% v/v) este último conteniendo además el cloruro de cobalto(II) hexahidrato. El método fue probado en 6 tipos de cremas del mercado y las variaciones antes mencionadas son el resultado de 18 formulas de ensayos pilotos durante el desarrollo para los dos tipos de cremas. Para ensayar la estabilidad del complejo, se tomaron durante 60 minutos lecturas en intervalos de 5 minutos, usando 3 estándares y 3 muestras de cremas, encontrándose el óptimo entre 10-15 minutos.

Preparación de la muestra y estándar (ensayo cuantitativo): Pesar con exactitud una cantidad de crema equivalente a 40.0 mg de clotrimazol (60.0 mg de ketoconazol), trasvasarla cuantitativamente a un pequeño embudo separador de 60 mL de capacidad, agregar 20 mL de cloroformo con pipeta volumétrica y luego adicionar 20 mL de agua destilada. Agitar fuertemente varias veces y dejar separar las fases aproximadamente 15 minutos (30 minutos para ketoconazol), hasta alcanzar una separación de las fases y de la interfase lipídica (la cual depende de la cantidad de emulsificantes y componentes grasos utilizada en la formula galénica). Separar muy lentamente (evitando el paso de interfase lipídica), aprox. 15 mL de la fase inferior clorofórmica sin turbidez, en una probeta de 25 mL. Tomar con la pipeta volumétrica una alícuota de 10 mL, trasvasarla a un balón volumétrico de 25 mL, agregar 2 mL de etanol y 0.3 mL de la solución al 3% (w/v) de $\text{CoCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ en acetona sin aforar. Se agita la mezcla y a partir de este momento se mide el tiempo. La concentración final de clotrimazol en esta solución es de 0.813 mg/mL (1.220 mg/mL para ketoconazol) y el color es de un celeste-agua intenso. Se trasvasa una alícuota de la solución a la celda UV y entre 10 y 15 minutos a partir del mezclado, se realiza la lectura en el espectrofotómetro UV-VIS. Determinar los tres máximos del espectro en el rango de 500-800 nm, usando cloroformo como blanco y anotando para el cálculo la absorbencia correspondiente a la longitud de onda a 577.2 nm (576.8 nm para ketoconazol). Se lleva un estándar a la par, pesando con exactitud 40.0 mg de clotrimazol (60.0 mg de ketoconazol) y dándole el mismo tratamiento como a la muestra, incluyendo la extracción. La absorbencia del estándar de clotrimazol en la mezcla final de solvente es normalmente de 0.735 (0.715 para ketoconazol). Nota: La solución de cobalto(II) en acetona se puede almacenar durante quince días, trasvasándola a un balón volumétrico ámbar y agregando unos 10 mg de sulfato de sodio anhidro.

6. Resultados y discusión

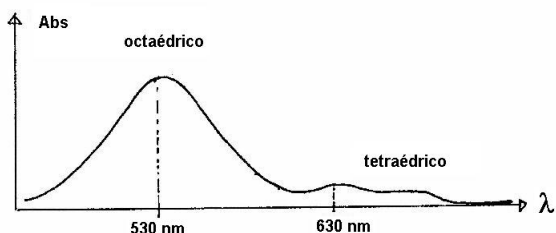


Fig. 1

Fig. 1: El complejo [Co(H₂O)₆]²⁺ se encuentra en el **disolvente** de 10 mL de cloroformo, 2 mL de etanol y 0.3 mL de acetona (CoCl₃·6 H₂O al 3% (w/v)) sobre todo en coordinación octaédrica con agua y en un porcentaje bajo en coordinación tetraédrica. El color rosado es característico para el octaédro.

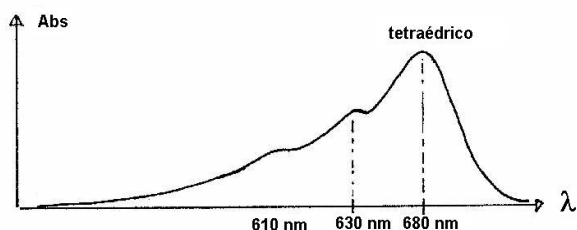


Fig. 2

Fig. 2: El complejo [Co(H₂O)₄]²⁺ en 0.3 mL de acetona anhidra presenta coordinación tetraédrica con agua (CoCl₃·6 H₂O al 3% (w/v)) y es de color azul intenso.

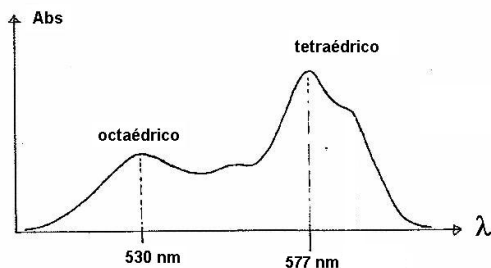


Fig. 3

Fig. 3: Agregando al **disolvente** (Fig. 1) clotrimazol o ketoconazol, la parte imidazólica cambia de forma selectiva al complejo tetraédrico con cobalto(II). En este disolvente clotrimazol y ketoconazol causan la absorbencia característica de la coordinación tetraédrica, apta para cuantificar. El cobalto(II) sobrante se mantiene en coordinación octaédrica con agua, sin afectar el complejo tetraédrico. Después de la extracción y en este disolvente, la longitud de onda máxima para el complejo tetraédrico es de forma reproducible a 577 nm, más hipocrómico que en acetona (Fig. 2), dado al cloroformo, etanol y la presencia de agua. Las longitudes de onda máxima de los complejos octaédrico y tetraédrico están separadas por aprox. 47 nm (6,8). El color celeste agua es característico.

En la parte del espectro visible domina la transición electrónica más energética de los estados de cuarteto de la configuración de los spin. En el caso octaédrico la transición electrónica es

(triplet) ${}^4T_{1g(F)} \longrightarrow {}^4T_{1g(P)}$ que se observa aproximadamente a 530 nm, y en el caso tetraédrico es la transición electrónica

(duplet-triplet) ${}^4A_{2(F)} \longrightarrow {}^4T_{1(P)}$ que se observa aproximadamente a 577nm, 610 nm y 630 nm, con tres bandas, dado al fenómeno de acoplamiento spin orbita (6).

Por la inestabilidad cinética de estos complejos, hay que tomar en cuenta el tiempo. Entre 10 y 15 minutos contado a partir del inicio, el complejo con cobalto(II) desarrolla de forma reproducible su máxima absorbencia, la cual permite determinar la concentración de clotrimazol o ketoconazol como principio activo en la crema. Linealidad y repetibilidad intermedia fueron realizados en estas condiciones.

Elementos de Validación del Método Analítico

Los parámetros que se evaluaron fueron la especificidad, límites de cuantificación y linealidad en un rango de 30%, precisión y repetibilidad intermedia (9). Dado a que no es un método indicativo de estabilidad, se realizaron sólo ensayos con activos imidazólicos y **no**-imidazólicos para comprobar la especificidad a clotrimazol y ketoconazol sin y con presencia de excipientes.

Límites de cuantificación y linealidad del método

Los límites de cuantificación del método se fijaron en el rango de 85% - 115% del contenido etiquetado, dado a que el método es para control de proceso (Rangos farmacopéicos: 90% -110%) (3,4,5).

Tabla 1. Rango y linealidad [3 valoraciones, sigma (n-1)]

Teórico	Ketoconazol recuperado	Clotrimazol recuperado
85%	86.0%±1.1%	83.8%±1.3%
90%	88.9%±1.0%	88.2%±1.5%
95%	96.2%±0.8%	94.1%±0.9%
100%	101.5%±1.1%	101.3%±1.2%
105%	105.7%±1.1%	103.8%±1.3%
110%	110.8%±1.0%	109.7%±1.4%
115%	115.1%±0.8%	114.4%±1.2%

Ketoconazol: (int.conf. 95%), pendiente = 1.004, coef.correl. r=0.997, CV var=0.011

Clotrimazol: (int.conf. 95%), pendiente = 1.032, coef.correl. r=0.996, CV var=0.011

Repetibilidad intermedia Para determinar la precisión del método se realizaron estudios de Repetibilidad intermedia (ensayos realizados en diferentes días). Este procedimiento se repitió en un lapso de 4 meses.

Tabla 2. Repetibilidad intermedia

	Primer Ensayo		Segundo Ensayo	
	Clotrimazol %	Ketoconazol %	Clotrimazol %	Ketoconazol %
1	98.5	99.2	104.2	105.1
2	99.1	101.9	97.8	101.0
3	102.5	103.9	99.5	100.0
4	97.9	102.5	102.0	98.2
5	98.2	97.5	100.0	97.2
6	100.1	97.3	97.2	103.8
7	98.6	102.4	98.9	101.5
8	101.8	101.7	100.5	99.8
9	98.7	99.2	99.8	102.3
10	98.3	99.4	97.5	101.1
Pr	99.4	100.5	99.7	101.0
D.E	1.45	2.05	1.95	2.16
CV	2.28	4.64	4.16	5.13

Recuperación promedio: 99.5% para clotrimazol y 100.7% para ketoconazol

7. Conclusiones

El método propuesto para la separación y cuantificación de clotrimazol y ketoconazol en cremas resultó satisfactorio y versátil, con límites de cuantificación acordes con la concentración de los analitos a determinar en las muestras durante un control en proceso. El uso de la formación de un complejo de cobalto(II) es interesante.

El método de extracción presenta un porcentaje de recuperación de 99.5% para clotrimazol y 100.7% para ketoconazol.

La repetibilidad intermedia del método cumple con los criterios de aceptación.

8. Referencias bibliográficas

1. Forth W. y Henschler D. 1977. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Wissenschaftsverlag, 2. Aufl., Mannheim, pp. 533.
2. Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. 2002. *Martindale - The complete drug reference*. 33rd edition, Pharmaceutical Press.
3. The United States Pharmacopeia Convention. 2002. *USP XXV*. Rockville, p. 494.
4. British Pharmacopeia. 2001. *BP 2001*. London, Stationery Office, p. 1965.
5. The United States Pharmacopeia Convention. 1980. *USP XX*. Rockville, p. 159.
6. Cotton F. A. y Wilkinson G. 1974. *Anorganische Chemie*. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 593, 683, 691, 936.
7. Jenkins D. M., Di Bilio A. J., Allen M. J., Betley T. A. y Peters J. C. 2002. Elucidation of a Low Spin Cobalt(II) System in a Distorted Tetrahedral Geometry. *J. Am. Chem. Soc.*, 124: 15336-15350.
8. Inada Y., Hotta N., Kuwabara H. y Funahashi S. 2001. Spectrophotometric Analysis of 5-Coordinate Cobalt(II) Species for Ligand Substitution of Hexakis(acetonitrile)cobalt(II) with Bulky 1,1,3,3-Tetramethylurea in Noncoordinating Nitromethane. *Analytical Sciences*, 17(1): 187.
9. de la Paz N., Jiménez L. E. y Morales I. G. 2003. Validación del método de análisis del ungüento transdérmico de nitroglicerina 2%. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 34(1): 37.

10. Agradecimiento

Se agradece al Dr. Charles Kohlstad por la revisión y sus valiosas sugerencias.