



Desenvolvimento e validação de método cromatográfico para o doseamento do cloridrato de bupropiona

Delazzeri, L.¹ ; Borba, S.B.¹; Bergold, A.M.^{1*}

¹ Departamento de Produção de Matéria-Prima, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

Recebido 04/10/05 / Aceito 20/02/06

RESUMO

O cloridrato de bupropiona é utilizado no tratamento da depressão e também indicado no tratamento da dependência à nicotina. O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um método por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE), alternativo ao oficial preconizado pela Farmacopéia Americana para a determinação quantitativa do cloridrato de bupropiona. O método difere do oficial por apresentar uma fase móvel simples, na qual não é necessária a utilização do solvente tetraidrofurano nem da solução tampão. Outra vantagem do método proposto é a de apresentar um tempo de retenção do fármaco relativamente curto. A estabilidade do fármaco frente a determinadas condições de estresse (hidrólise, oxidação e fotólise), também foi avaliada. O método mostrou-se específico, preciso, linear, exato e robusto podendo ser utilizado como alternativa ao método oficial preconizado pela Farmacopéia Americana em ensaios de controle de qualidade. Os resultados obtidos na avaliação do fármaco quando submetido a determinadas condições de estresse sugerem que o fármaco é susceptível à fotólise. *Palavras-chave:* Bupropiona, validação, CLAE.

INTRODUÇÃO

O cloridrato de bupropiona, cloridrato de (±)-2-tert-butilamino-3'-cloro-propionfenona (Figura 1), também conhecido como anfebutamona (rINN) foi inicialmente classificado como um fármaco antidepressivo. Atualmente, o fármaco também é indicado no tratamento da dependência à nicotina e como adjuvante na terapia de cessação tabágica. Estudos recentes indicam que o fármaco é vantajoso no tratamento da depressão quando comparado a outros antidepressivos, pois apresenta menor incidência de disfunções sexuais (Coleman et al, 2001). Devido à diversidade de indicações terapêuticas, o fármaco está sendo amplamente utilizado clinicamente.

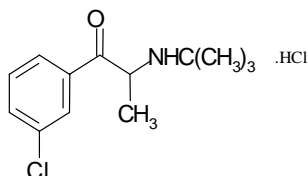


Figura 1 - Estrutura química do cloridrato de bupropiona

O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um método cromatográfico (CLAE) alternativo ao oficial preconizado pela Farmacopéia Americana (*United States pharmacopeia*, 2005) para a determinação quantitativa do cloridrato de bupropiona. Considerando que a literatura relata que o fármaco deve ser conservado em frascos bem fechados e ao abrigo da luz (*United States pharmacopeia*, 2005) e que é substância higroscópica, que sofre decomposição (O'Neil, 2001), avaliou-se o comportamento do mesmo frente a determinadas condições de estresse.

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais e equipamentos

Cloridrato de bupropiona padrão adquirido da Farmacopéia Americana (USP), lote: FOC123, cloridrato de bupropiona amostra gentilmente fornecido pelo laboratório LIBBS®, lote: NL028773; acetonitrila grau HPLC; água purificada obtida através de Milli-Q para uso em CLAE. Os demais solventes utilizados foram de grau analítico. Cromatógrafo líquido SHIMADZU LC-10AD VP com detector de arranjo de diodos SPD-M10A, degaseificador DGU-14A, central de controle SCL-10A e injetor manual com loop de 20µL; coluna cromatográfica Lichrosorb RP-18 125 x 4 mm (Merck).

Metodologia

A fase móvel foi selecionada através da análise dos parâmetros cromatográficos obtidos quando a constituição, a proporção dos solventes e a variação do pH na fase móvel foram alterados. O solvente orgânico selecionado foi a acetonitrila por apresentar melhor simetria do pico referente à bupropiona em relação ao metanol. A adição de monoisopropilamina à fase móvel melhorou o fator de cauda do pico referente ao fármaco. As condições cromatográficas que apresentaram melhores resultados na análise do cloridrato de bupropiona estão apresentadas na Tabela 1.

*Autor correspondente: Ana Maria Bergold - Departamento de Produção de Matéria-Prima - Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS - 90610-000 - Porto Alegre - RS - E-mail: bergold@farmacia.ufrgs.br - Tel: (51) 3316-5451 - Fax (51) 3316-5313

Doseamento de bupropiona: validação de método

Tabela 1 - Condições cromatográficas empregadas para a análise do cloridrato de bupropiona por CLAE.

Características	Descrição
Fase Móvel	Água: ACN (60:40 v/v) - 0,5% monoisopropilamina pH6,4 (H ₃ PO ₄ - 20%)
Vazão	1,2 mL/min
Comprimento de onda	250 nm

O método foi validado segundo os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez (International Conference on Harmonization-ICH, 1996).

A especificidade do método foi avaliada submetendo o fármaco a determinadas condições de estresse, a fim de forçar a formação de produtos de degradação, com o objetivo de verificar a possível interferência dos mesmos na determinação quantitativa da bupropiona, através do método proposto.

Cada solução submetida à análise continha cerca de 1mg/mL de cloridrato de bupropiona.

Hidrólise ácida: A avaliação da decomposição em meio ácido foi realizada dissolvendo a amostra em HCl 0,1 M e aquecendo-a em banho termostatizado por duas horas à temperatura de 100 ± 1 °C. Sob esta condição a amostra apresentou pequena diminuição do teor. Devido a este fato o ensaio foi repetido nas mesmas condições porém aumentando a força do ácido (HCl 1M).

Hidrólise alcalina: A avaliação da decomposição em meio alcalino foi realizada dissolvendo a amostra em NaOH 0,1 M.

Oxidação: A avaliação da degradação do fármaco sob condições oxidativas foi realizada com H₂O₂ 30%, à temperatura ambiente durante 24 horas e sob aquecimento em banho termostatizado de 80 ± 1 °C durante três horas.

Temperatura: Aproximadamente 50mg da amostra foram pesados e levados à estufa a 80 °C durante 24 horas.

Luz ultravioleta (UV): O estudo fotolítico foi realizado submetendo a amostra à radiação ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 352nm. No comprimento de onda de 254nm a amostra foi submetida durante duas horas. No comprimento de onda de 352nm a amostra foi submetida durante 24 horas e em uma segunda etapa durante 240 horas.

Quando necessário, após cada condição de estresse, as soluções foram neutralizadas e diluídas antes de serem analisadas por CLAE. Para cada condição foi preparada uma solução branco (solvente usado em cada uma das condições, mas sem o analito), a qual foi submetida às mesmas condições de estresse da amostra.

A linearidade do método foi demonstrada através da construção de três curvas padrão em três dias diferentes contendo sete níveis de concentração (10, 20, 40, 60, 80, 100 e 120µg/mL) em cada uma delas. Cada solução aquosa foi determinada três vezes. As médias das áreas absolutas obtidas através da análise das soluções foram utilizadas para a construção da curva padrão. A linearidade do método foi verificada através da análise de variância [ANOVA] (Miller & Miller, 1988).

A precisão do método foi avaliada preparando-se seis soluções aquosas com concentração de cloridrato de

bupropiona amostra de 60µg/mL cada. Foram realizadas três determinações para cada solução. A repetibilidade intra-dia foi avaliada através do desvio padrão relativo das médias das seis determinações. A repetibilidade inter-dias foi avaliada determinando o desvio padrão relativo apresentado em três dias diferentes de análise.

A robustez do método foi avaliada através dos cromatogramas obtidos após terem sido realizadas alterações na fase móvel.

RESULTADOS

O cromatograma referente ao cloridrato de bupropiona está apresentado na Figura 2. Como pode ser observado o tempo de retenção do fármaco foi de 8,14 min; assimetria igual a 1,24; pratos teóricos em torno de 3300 e pureza total do pico igual a 1,00, verificada com auxílio de detector de arranjo de diodos.

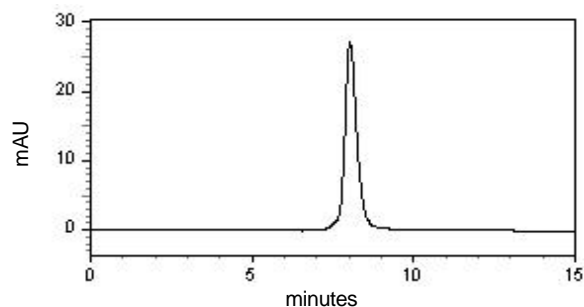


Figura 2 - Cromatograma referente ao cloridrato de bupropiona

Especificidade

Hidrólise ácida: A hidrólise ácida em HCl 0,1 M durante duas horas diminuiu o teor do fármaco, porém não foram detectados no UV produtos de degradação. Em HCl 1M, sob aquecimento durante duas horas, foi possível verificar a formação de prováveis produtos de degradação (Figura 3).

Estresse oxidativo: Não houve a formação de produtos de degradação detectáveis através deste método após a exposição do fármaco a estas condições (Figura 3). O pico apresentado em 0,99 min é referente à solução de H₂O₂ 30%.
Temperatura: O cromatograma resultante está demonstrado na Figura 3. Sob estas condições não houve diminuição do teor do fármaco.

Fotólise: Sob a radiação de 254nm foi possível verificar a degradação do fármaco bem como a formação de produtos de degradação. Ocorreu a diminuição de aproximadamente 80% do teor do fármaco. A pureza total do pico do fármaco é de 0,998 e a resolução entre o pico do fármaco e o pico adjacente é de 3,36 (Figura 4). Os espectros no UV do fármaco e dos produtos de degradação formados nestas condições estão apresentados na Figura 4.

Sob a radiação de 352nm durante 24 horas o teor médio do fármaco encontrado foi de 97% e após 240 horas de radiação, o teor médio encontrado foi de 67% (Figura 5).

Doseamento de bupropiona: validação de método

Minutes Minutes

Minutes Minutes

Figura 3 - Cromatogramas referentes ao cloridrato de bupropiona após a exposição do fármaco às condições de estresse. Fase móvel constituída por água e acetonitrila (60:40) com adição de 0,5% de monoisopropilamina, pH=6,4, coluna C₁₈ (150 mm x 4,9 mm, 5µm). Cromatograma 1: solução de cloridrato de bupropiona controle. Cromatograma 2: hidrólise em HCl M durante duas horas sob aquecimento a 100 ± 1 °C. Parâmetros cromatográficos referentes ao pico do fármaco: T.r. = 8,22 min; Ass. = 1,14; Pureza pico = 0,999. Cromatograma 3: oxidação em H₂O₂ 30% durante três horas a 80 ± 1 °C. Parâmetros cromatográficos referentes ao pico do fármaco: T.r. = 8,25 min; Ass. = 1,35; Pureza pico = 0,999. Cromatograma 4: exposição do fármaco à temperatura de 80 °C em estufa durante vinte e quatro horas. Parâmetros pico cromatográfico referente ao fármaco: T.r. = 8,03 min; Ass. = 1,34; Pureza pico = 0,998

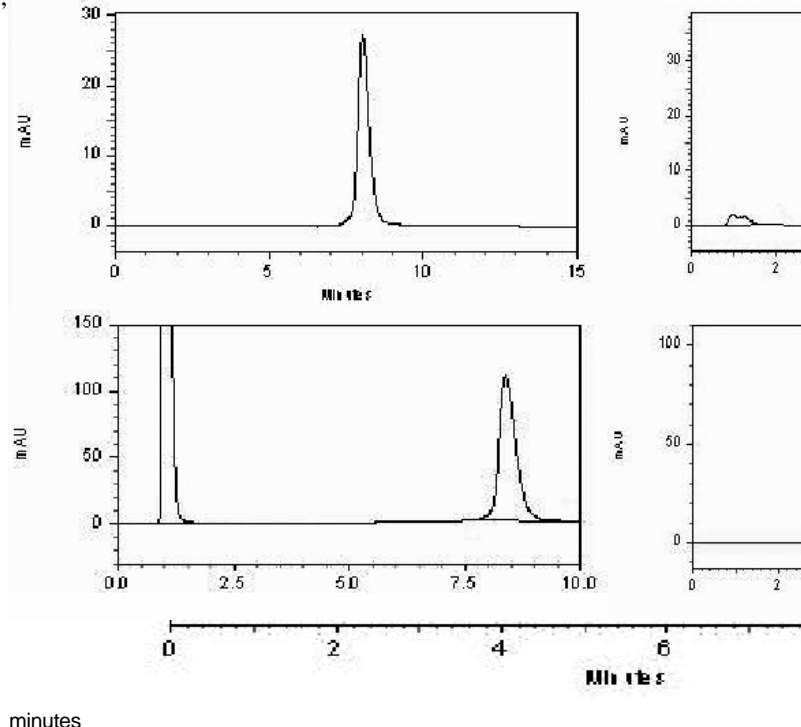


Figura 4 - Cromatograma da solução de cloridrato de bupropiona submetida à fotólise em lâmpada ultravioleta (254 nm) durante duas horas. Fase móvel constituída por água e acetonitrila (60:40) com adição de 0,5% de monoisopropilamina, pH=6,4, coluna C₁₈ (150 mm x 4,9 mm, 5µm). Parâmetros cromatográficos referentes ao pico do fármaco: T.r. = 8,32 min; Ass. = 1,11; Pureza pico = 0,998; Res. = 3,36. Espectros na região do ultravioleta referente aos picos cromatográficos A (1,09 min), B (5,72 min) e C (8,28 min -cloridrato de bupropiona-).

mAU

minutes

Figura 5 - Cromatograma do cloridrato de bupropiona submetido à fotólise em lâmpada ultravioleta (352 nm) durante 240 horas. Fase móvel constituída por água e acetonitrila (60:40 v/v) com adição de 0,5% de monoisopropilamina, pH = 6,4, coluna C₁₈ (150 mm × 4,9 mm, 5 μm). Parâmetros cromatográficos referentes ao pico do fármaco: T. r. = 7,5 min, Ass. = 1,38, Pureza do pico = 1,000.

Linearidade

A análise dos resultados indicou existir uma correlação linear entre as áreas obtidas e a concentração do cloridrato de bupropiona padrão. Através do estudo de regressão linear foi possível obter a equação da reta $y = 37161x - 11333$ com um coeficiente de correlação de 0,9999. A análise estatística através da ANOVA demonstrou regressão linear significativa ($p < 0,05$) e desvio da linearidade não significativo.

Precisão

Os resultados obtidos na avaliação da precisão intra-dia e inter-dias estão apresentados na Tabela 2.

Robustez

Os resultados obtidos na avaliação da robustez estão apresentados na Tabela 3.

DISCUSSÃO

A escolha das condições de estresse empregadas em cada ensaio realizado na avaliação da especificidade do

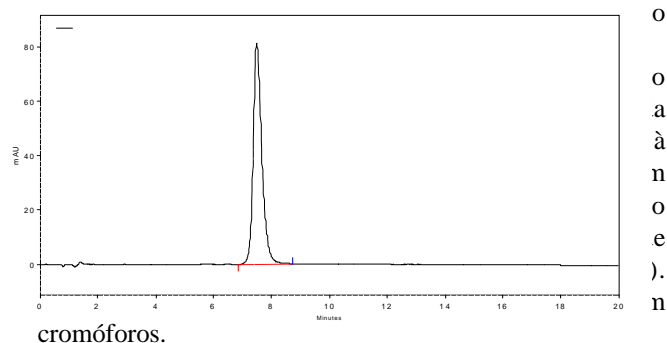
método proposto baseou-se em dados apresentados na literatura (ICH, 1996; Lambropoulos et al., 1999s; Bakshi et al., 2001; Bakshi & Singh, 2002; Bakshi & Singh, 2003).

Os prováveis produtos de degradação formados a partir da exposição do fármaco à hidrólise ácida não interferem no doseamento deste (pureza pico=0,999). Tais produtos apresentam características mais polares que o fármaco e aparecem em tempo de retenção em torno de 1,3 min.

Na avaliação da hidrólise alcalina, após a adição da solução de NaOH 0,1M houve a formação de gotículas oleosas de coloração amarela. A bupropiona base apresenta-se como líquido oleoso e amarelo, (O'Neil, 2001), insolúvel no meio reagente, impossibilitando análise quantitativa.

O método proposto não evidenciou a formação de produtos de degradação quando o fármaco foi exposto ao calor, nas condições citadas anteriormente. Estes resultados sugerem que o fármaco não é facilmente degradado pelo calor.

Os resultados obtidos (pureza do pico e resolução) após a exposição do fármaco à luz UV nas condições citadas, indicam que o método é capaz de determinar quantitativamente o fármaco sem a interferência dos produtos formados. Comparando os espectros na região do UV (254nm) do fármaco e do produto de degradação eluído em aproximadamente cinco minutos observa-se que ambos são semelhantes ou praticamente iguais (Figura 3). Este fato pode indicar que o produto de degradação formado



cromóforos.

Os resultados obtidos conferem especificidade ao método, uma vez que este é capaz de analisar de forma inequívoca o cloridrato de bupropiona na presença de produtos de degradação, quando estes forem formados a partir da exposição do fármaco às condições experimentadas neste estudo.

Tabela 2 - Resultados da avaliação da precisão intra-dia e inter-dias.

	Intra-dia (n=6)		Inter-dias (n=18)	
	Média (%) * ± e.p.m.	DPR (%)	Média (%) ± e.p.m.	DPR (%)
Dia 1	99,63 ± 0,32	0,80		
Dia 2	99,97 ± 0,09	0,22	99,94 ± 0,22	0,93
Dia 3	99,83 ± 0,43	1,05		

* cada valor representa a média de três determinações do teor de cloridrato de bupropiona em seis amostras

Doseamento de bupropiona: validação de método

TABELA 3 - Avaliação da robustez do método por CLAE - alterações no valor de pH e na proporção dos solventes da fase móvel.

	T. r. (min)	Ass.	Pureza pico	Teor (%)*	DPR
Método Original					
Água : ACN (60 : 40, v/v) 0,5% Monoisopropilamina pH = 6,4 (H ₃ PO ₄ 20%)	8,14	1,24	1,00	99,85	0,76
Água : ACN (60 : 40, v/v) 0,5% Monoisopropilamina pH = 6,3 (H ₃ PO ₄ 20%)	7,71	1,23	0,999	99,72	0,69
Água : ACN (60 : 40, v/v) 0,5% Monoisopropilamina pH = 6,5 (H ₃ PO ₄ 20%)	9,84	1,07	0,999	99,33	0,40
Água : ACN (65 : 35, v/v) 0,5% Monoisopropilamina pH = 6,4 (H ₃ PO ₄ 20%)	12,20	1,30	0,998	99,85	0,86

* valor representa a média de três determinações ou injeções
T.r. = tempo de retenção; Ass. = assimetria; ACN = Acetonitrila

O DPR obtido na avaliação da precisão do método é adequado podendo atribuir-lhe alto grau de concordância entre os resultados quando realizados sob as mesmas condições experimentadas neste estudo.

Apesar da alteração de alguns parâmetros, principalmente em relação ao tempo de retenção o método é robusto, permitindo determinar quantitativamente o fármaco, pois os teores encontrados são muito próximos aos obtidos na determinação da precisão.

De acordo com as normas do ICH (1996), a exatidão pode ser inferida, desde que a precisão, linearidade e especificidade sejam estabelecidas. Sendo assim, pode-se afirmar que o método proposto é exato, visto que estes parâmetros foram avaliados.

O método desenvolvido e validado por CLAE é um método alternativo ao método farmacopéico para a determinação quantitativa do cloridrato de bupropiona. Apresenta a vantagem de não utilizar solução tampão nem o solvente tetraidrofurano na composição da fase móvel. Possibilita também um tempo de análise inferior quando comparado àquele método. É útil na análise de rotina do fármaco, em ensaios de controle de qualidade e estudos de estabilidade.

Os resultados obtidos na avaliação do cloridrato de bupropiona quando submetido à fotólise sugerem que o fármaco é sensível à luz.

ABSTRACT

Development and validation of a chromatographic method for the determination of bupropion hydrochloride

Bupropion hydrochloride is used as an antidepressant

and is also prescribed as an aid to those trying to quit smoking. In this study the aim was to develop and validate a method for quantitative analysis of this drug, based on high-performance liquid chromatography, which can be used as an alternative to the official one recommended in the American Pharmacopeia. A novel feature of the proposed method is that neither tetrahydrofuran nor buffer solution is required in the mobile phase. Another advantage over the official method is the small retention time. The method was used to evaluate drug stability under harsh conditions (hydrolysis, oxidation and UV irradiation). The results confirm that the method is specific, accurate, linear, precise and robust. Therefore, it can be used as an alternative to the official method in quality control. The stability evaluation suggests that the drug must be protected from light.

Keywords: Bupropion, validation, HPLC.

Este trabalho é parte da Dissertação de Mestrado de Liliana Delazzeri desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS.

REFERÊNCIAS

Bakshi M, Singh S. Estudo de degradação forçada em metronidazol e desenvolvimento de método de análise por HPLC indicador de estabilidade validado. *Pharm Technol* 2003;7(6):40-7.

Bakshi M, Singh B, Singh A, Singh S. The ICH guidance in practice: stress degradation studies on ornidazole and

Doseamento de bupropiona: validação de método

- development of a validated stability-indicating assay. *J Pharm Biomed Anal* 2001;6:891-7.
- Bakshi M, Singh S. Development of validated stability-indicating assay methods-critical review. *J Pharm Biomed Anal* 2002;28:1011-40.
- Coleman CC, King BR, Watson CB, Book MJ, Segraves RT, Richard N, Aschaer J, Batey S, Jamerson B, Metz A. A placebo-controlled comparison of the effects on sexual functioning of bupropion sustained release and fluoxetine. *Clin Therapeutics* 2001;23:1040-58.
- International Conference on Harmonization. Topic 2B. Validation of analytical procedures: methodology. London: The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products; 1996. Disponível em URL: <http://www.ich.org> [18 fev 2005]
- Lambropoulus J, Spanos GA, Lazaridis NV. Method development and validation for the HPLC assay (potency and related substance) for 20mg paroxetine tablets. *J Pharm Biomed Anal* 1999;19:793-802.
- Miller JC, Miller JN. *Statistics for analytical chemistry*. 2nd.ed. Horwood: Chichester, 1988. 227p.
- O'Neil MJ, editor. *The merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*. 13th.ed. Whitehouse station: MERCK; 2001. p.246-7
- United States pharmacopeia. 28th.ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2005. p.296-7