

Influența unor factori asupra stabilității spironolactonei în soluție

DANIELA LUCIA MUNTEAN, SILVIA IMRE*, COSMINA VODĂ

Universitatea de Medicină și Farmacie din Târgu-Mureș, Facultatea de Farmacie, Departamentul de Analiza medicamentului, Str. Gheorghe Marinescu, Nr. 38, 540139 Târgu-Mureș, România

The influence of some factors on spironolactone stability in solution was studied, by applying high-performance liquid chromatography, as a part of a pharmaceutical preformulation study in order to obtain a spironolactone solution for alopecia treatment. Solutions of 1 mg/ml spironolactone in aqueous ethanolic solution 1 : 1 and in 20 mM cyclodextrines solutions (β -, hydroxy- β - and methyl- β -cyclodextrine) was used, maintained at 8 and 22 °C, protected from light and after UV irradiation at 254 nm. The main degradation products were 7 α -thiospirolactone and canrenone. The most stable solutions were the alcoholic ones and with methyl-beta-cyclodextrine, but the simultaneous action of temperature and UV irradiation allowed degradation processes after one hour of exposure, more aggressive in the presence of methyl-beta-cyclodextrine. In conclusion, for alopecia treatment with spironolactone a 1 mg/mL ethanolic solution could be used and it is recommendable the protection of treated zone.

Keywords: spironolactone, cyclodextrines, stability

Lucrarea însumează rezultatele experimentale ale unui studiu referitor la stabilitatea spironolactonei (7 α -acetiltio-3-oxo-17 α -pregn-4-ene-21,17-carbolactonă) în soluție sub influența unor factori de stres, lumină și temperatură. S-a plecat de la premisa posibilității de utilizare a spironolactonei (SPR) într-o soluție de uz extern în tratamentul alopeciei androgenice, numeroase studii de specialitate [1] evidențiind caracterul de inhibitor androgenic tipic al spironolactonei, prin blocarea receptorilor DHT la nivelul foliculilor de păr.

La obținerea formelor farmaceutice cu SPR, o problemă importantă de care trebuie să se țină cont este solubilitatea scăzută a acesteia. Solubilitatea SPR poate fi mărită în mai multe moduri, prin formare de complexe de incluziune sau utilizare de cosolvenți sau solvenți organici adecvați [2-5]. Ciclodextrinele (CD), caracterizate structural de prezența unui inel oligozaharidic, lipofil la interior și hidrofil la exterior, sunt capabile să interacționeze cu o varietate mare de molecule pentru a forma complexe de incluziune (fig. 1). Efectele complexării variază de la îmbunătățirea solubilității, dizolvării, biodisponibilității etc. până la influențarea stabilității substanței complexate sau crearea unor sisteme terapeutice cu transport la țintă [6]. Derivații chimici ai ciclodextrinelor părinte (α -, β -, γ -CD, diferite prin

numărul de resturi de glucoză pe care le conțin) au volumul cavității hidrofobe modificat, determinând îmbunătățirea solubilității și stabilității moleculei complexate. β -CD a fost foarte mult folosită inițial în acest scop, dar solubilitatea scăzută în apă și nefrotoxicitatea îi limitează utilizarea, în special în cazul administrării parenterale sau orale. Derivații chimici hidrofilii ai acesteia, cum ar fi hidroxipropil- β -CD (HP- β -CD), metil- β -CD (M- β -CD) și sulfobutyleter- β -CD (SPE- β -CD), conferă SPR o solubilitate superioară și stabilități îmbunătățite comparativ cu β -CD [7].

Pe de altă parte se cunoaște deja că pH-ul optim de stabilitate a SPR în soluție este 4,5 [8], având o stabilitate foarte bună în suspensii [9]. Deși se cunoaște natura principalilor produși de degradare [7,10], 7- α -tiospirolactona și canrenona (fig. 2), și există un număr important de articole publicate în legătură cu stabilitatea SPR, referințele bibliografice recente legate de controlul calității formelor farmaceutice cu SPR [11] indică potențialul explorator al acestui subiect.

Din câte se cunoaște, nu există referințe bibliografice în care să fie descrisă influența radiațiilor electromagnetice asupra stabilității SPR, un aspect deosebit de important ținând cont de utilizarea acesteia în soluție în tratamentul alopeciei.

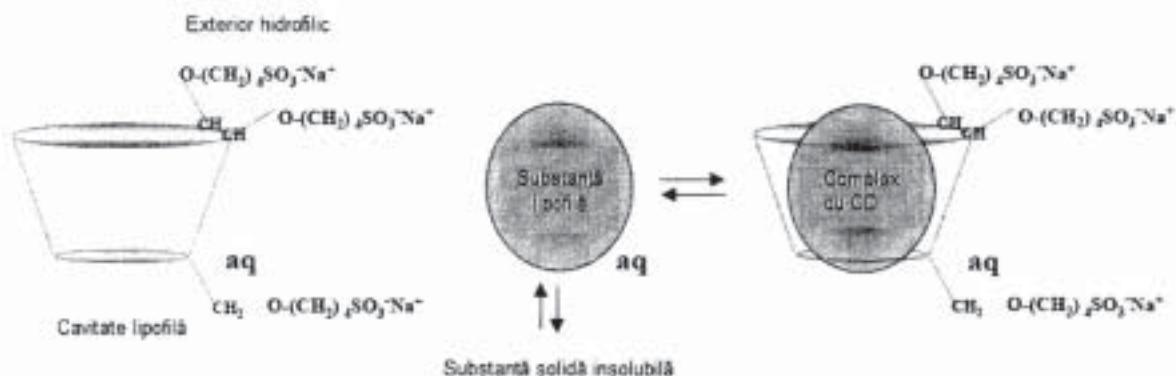


Fig. 1. Creșterea solubilității unei substanțe medicamentoase prin complexare cu ciclodextrine (CD)

* email: silsta@yahoo.com

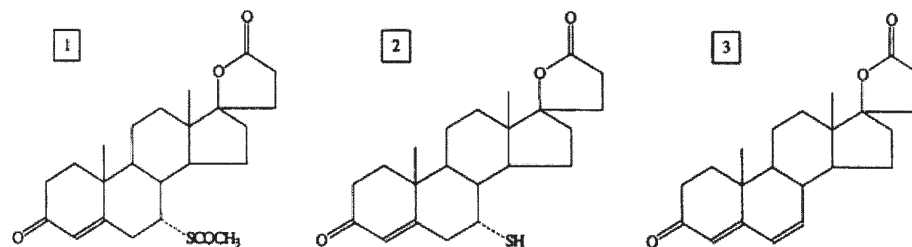


Fig. 2. Structurile chimice ale 1-spironolactonei, 2- 7 α -tiospirolactonei și 3- canrenonei

Pinând cont de cele prezentate anterior, etapele parcurse în vederea atingerii scopului propus au fost: solubilizarea SPR, degradarea SPR și optimizarea separării HPLC, studiul stabilității SPR sub influența temperaturii și luminii.

Partea experimentală

Materiale și metodă

S-au utilizat următoarele substanțe de referință și reactivi: spironolactonă (standard de lucru, Bioeel, România); canrenonă (Farmacopeea Europeană); β -CD, HP- β -CD, metil- β -CD (Cyclolab, Ungaria); acetonitril gradient grade, metanol gradient grade, tetrahidrofuran pentru cromatografie, etanol absolut, acid clorhidric concentrat, acetat de amoniu, hidroxid de potasiu (Merck, KGa Darmstadt, Germania).

Aparatură

-sistem de cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC) 1100 (Agilent Technologies, SUA), format din pompă cuaternară, degazor, injector automat, termostat coloană, detector în ultraviolet (UV), detector de spectrometrie de masă (MS) tip *ion trap* cu sursă de ionizare prin *electrospray*-ere (ESI)

-spectrofotometru UV 1601 (Shimadzu, Japonia)
-balanță AB54S (Mettler-Toledo, Elveția)
-aparat de purificat apa Direct Q5 (Millipore, Franța)
-baie cu ultrasunete Transsonic T700/H (Elma, Germania)

-lampă UV VL-4L.C. (Vilber Lourmat, Franța), putere 4 W

Condiții HPLC-UV:

-coloană Zorbax Extend C18, 250 x 4,6 mm, 5 μ m (Agilent Technologies), protejată de coloană Chromolith RP18e (Merck)

-faza mobilă: 92%A, 8%B, unde:

- A: apă:tetrahidrofuran = 37:9

- B: acetonitril

-debitul fazei mobile: 1,4 mL/min

-temperatura coloanei: 40 °C

-deteție la 254 nm

Condiții HPLC cu deție de spectrometrie de masă (HPLC-MS):

-coloană Zorbax SB-C18, 100 x 3 mm, 3,5 μ m

-faza mobilă: 60% metanol, 40% acetat de amoniu 1 mM

-debit: 0,8 mL/min

-temperatura coloanei: 45°C

-deteție în mod MRM (341 $\rightarrow$ 305, 287, 283, 204,9, 186,9, 168,9)

S-a obținut o soluție stoc de SPR 1 mg/mL în soluție amestec etanol - apă 1:1, raport volumic, prin cântărirea exactă a 10,0 mg SPR într-un balon cotat de 10 mL, dizolvare în baie cu ultrasunete în aproximativ 5 ml solvent, aducere la semn cu același solvent și omogenizare. Obținerea curbei de calibrare pentru analiza HPLC-UV s-a făcut pe baza a 6 soluții standard (N=6) de SPR obținute prin diluarea cu apă a soluției stoc 1 mg/mL SPR în soluție

amestec etanol - apă 1:1, raport volumic, și având concentrațiile cuprinse între 1 și 20 μ g/mL SPR. Curba de calibrare a fost realizată în același mod de trei ori (n=3), în calcule folosindu-se media semnalului măsurat.

O cantitate de 10,0 mg canrenonă cântărită cu exactitate într-un balon cotat de 10 mL este dizolvată în 8 mL soluție amestec etanol - apă 1:1, raport volumic, prin menținere în baie cu ultrasunete. După aducere la semn cu același solvent și omogenizare s-a obținut o soluție stoc cu concentrația 1 mg/mL canrenonă din care s-a obținut o soluție standard cu concentrația 10 μ g/mL prin diluarea a 0,1 mL soluție stoc la 10 mL cu apă. Soluția standard de canrenonă a fost folosită imediat după preparare pentru identificarea prin spectrofotometrie și HPLC a canrenonei în probe.

Amestecul standard de SPR și canrenonă cu concentrațiile fiecare de 10 μ g/mL s-a obținut prin diluarea a câte 0,1 mL din fiecare soluție stoc de SPR și canrenonă la 10 mL cu apă, fiind analizat imediat după preparare în diferitele etape experimentale prin metodele HPLC-UV și HPLC-MS.

Probele utilizate în studii au fost: soluție de SPR 1 mg/mL în soluție amestec etanol - apă 1:1, raport volumic; soluție de SPR 1 mg/mL în soluție apoasă 20 mM de β -CD; soluție de SPR 1 mg/mL în soluție apoasă 20 mM HP- β -CD; soluție de SPR 1 mg/mL în soluție apoasă 20 mM M- β -CD. Obținerea acestora s-a făcut în modul următor: câte 20,0 mg SPR exact cântărite în balon cotat de 20 mL s-au solubilizat în circa 10 mL soluție amestec etanol - apă 1:1, raport volumic, și, respectiv, soluții apoase de CD, cu concentrațiile menționate anterior, prin menținere în baie cu ultrasunete, fiind aduse apoi la semn cu același solvent.

În ceea ce privește studiile de stabilitate, pentru stabilirea influenței temperaturii determinările s-au efectuat la două temperaturi, 8°C și 22°C, pe o perioadă de 24 h, iar pentru studierea influenței luminii s-a lucrat la 22°C și, respectiv, 254 nm, cu o putere a lămpii de 4 W, probele fiind menținute în cuve de cuarț de 1 cm cu capac și prelevate la 0, 1, 2 și 4 h de expunere.

Analiza probelor caracterizate anterior s-a făcut în variate situații experimentale imediat după diluarea de 100 de ori cu apă prin metode spectrofotometrice și cromatografice (HPLC-UV, HPLC-MS).

Rezultate și discuții

Solubilizarea și degradarea spironolactonei în vederea stabilirii condițiilor cromatografice de specificitate în raport cu produșii de degradare

Stabilirea condițiilor optime de solubilizare a spironolactonei s-a făcut pornind de la faptul că aceasta este foarte puțin solubilă în apă (~30 μ g/mL). Solubilizarea SPR la un nivel de concentrație de 1 mg/mL s-a realizat cu soluții de ciclodextrine (β -CD, HP- β -CD, metil- β -CD) cu concentrațiile 20 mM fiecare și soluție amestec etanol - apă 1:1, raport volumic. Nivelul de concentrație ales, 1 mg/mL SPR, este în legătură cu acțiunea farmacologică a soluțiilor de uz extern cu SPR.

Lipsa substanțelor de referință, produși de degradare ai SPR, exceptând canrenona, a determinat o degradare prealabilă a SPR în mediu alcalin cu KOH 0,01 M, luând în considerare faptul că principala cale de degradare a SPR este hidroliza grupării tioacetamidice cu formare de 7 α -tiospirolactonă. În vederea analizei HPLC cu detecție în UV compoziția fazei mobile a fost astfel modificată încât s-a reușit o separare completă a SPR ($t_R = 19,8$ min) față de produși de degradare.

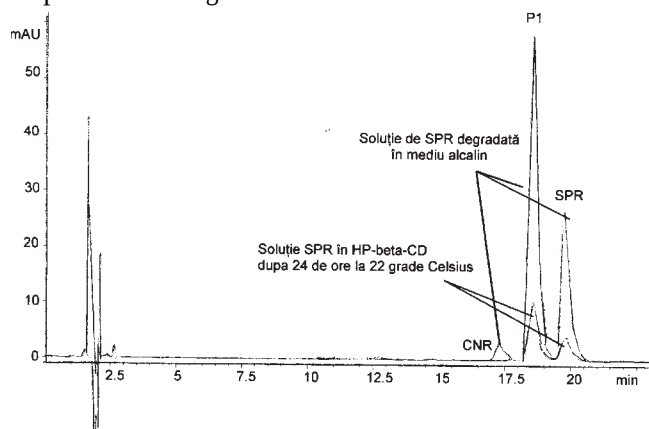


Fig. 3. Cromatogramele unor soluții de SPR 1 mg/mL după degradare timp de 4 h în mediu alcalin și, respectiv, 24 h în prezența HP-β-CD

Degradarea în mediu alcalin a unei soluții cu concentrația 1 mg/mL SPR a evidențiat în cromatogramă (fig. 3) formarea în timp a cel puțin doi produși de degradare: canrenona, $t_R = 17,45$ min; un produs de degradare majoritar, P₁, presupus a fi 7 α -tiospirolactonă ($t_R = 18,6$ min). Ținând seama de faptul că β-CD și HP-β-CD favorizează în timp degradarea spironolactonei [10, 12] la 7 α -tiospirolactonă, soluții de 1 mg/mL SPR în cele două ciclodextrine au fost analizate după 24 h de menținere la temperatura camerei. După cum se observă din reprezentarea comparativă din figura 3, produsul de degradare majoritar P₁ este 7 α -tiospirolactonă și se poate afirma faptul că, în condițiile cromatografice propuse, SPR este separată specific în raport cu principalii produși de degradare, 7 α -tiospirolactonă și canrenona.

Determinarea cromatografică cantitativă a spironolactonei s-a făcut prin metoda standardelor externe. În condițiile cromatografice HPLC-UV stabilite, ecuația medie a curbei de calibrare pe domeniul de concentrații 1 – 20 μg/mL a fost: $Aria = 54,58(\pm 0,21) C + 3,01(\pm 2,5)$, $r > 0,999$, $N = 6$ puncte, $n = 3$ replicări. Rezidualii (diferența relativă a concentrațiilor recalculate din dreapta de calibrare față de concentrația teoretică a soluțiilor standard folosite la obținerea dreptei de calibrare) s-au încadrat între limitele $\pm 2\%$, fără o tendință de variație cu concentrația, ceea ce denotă faptul că modelul de calibrare ales este adecvat, abaterile de la dreapta de calibrare nefiind datorate unor erori sistematice.

Influența temperaturii asupra stabilității spironolactonei

S-a urmărit cromatografic HPLC-UV modificarea concentrației SPR și formarea produșilor de degradare în timp la temperatura camerei, respectiv, la rece. Soluțiile de SPR 1 mg/mL solubilizată în CD și în amestec etanol : apă = 1 : 1 au fost menținute la 8 °C și, respectiv, 22 °C. Probele au fost prelevate la diferiți timpi pe o perioadă de cel puțin 24 h și analizate imediat după diluare de 100 de ori cu apă. Determinarea concentrației s-a făcut prin raportare la curba de calibrare a zilei.

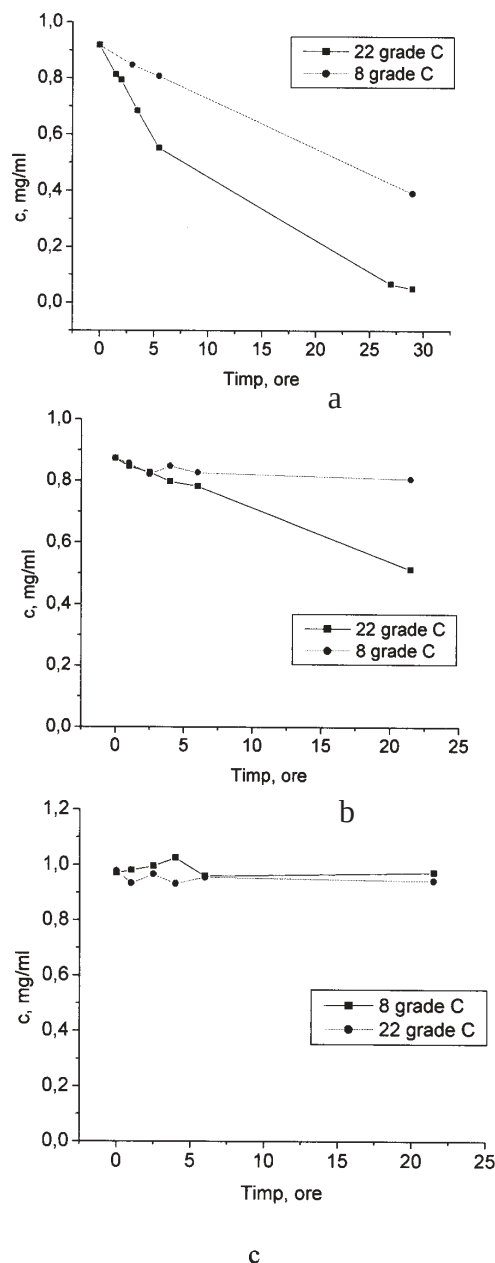


Fig. 4. Influența temperaturii asupra stabilității SPR în soluții de: a- β-CD, b- HP-β-CD și c- Metil-β-CD

Analizând cromatogramele corespunzătoare și corelând cu reprezentarea grafică a scăderii concentrației în timp (fig. 4) se constată următoarele: în cazul β-CD și HP-β-CD, o degradare mult mai accentuată a SPR la 22 °C decât la 8 °C, degradarea decurgând, cel mai probabil, după o cinetică de rdinul I la 22 °C și ordinul 0 la $t < 8$ °C; în ceea ce privește comportamentul SPR în prezența metil-β-CD, aceasta este stabilă cel puțin 20 de ore, atât la 22 °C, cât și la 8 °C, același lucru constatându-se și în cazul soluției de SPR olubilizată în amestec apă : etanol = 1 : 1, raport volumic.

Achiziția luminii și temperaturii asupra stabilității SPR

S-au luat în lucru soluțiile cele mai stabile la temperatura camerei: 1 mg/mL SPR în soluție 20 mM metil-β-CD și, respectiv, în soluție apă : etanol = 1 : 1, raport volumic.

S-au constatat următoarele:

- modificarea netă a proprietăților organoleptice chiar di prima oră a expunerii (tulbureală, culoare gălbuie, miros specific)

- probele prelevate pentru analiza HPLC-UV și spectrofotometrică (fig. 5 și 6) au demonstrat scăderea

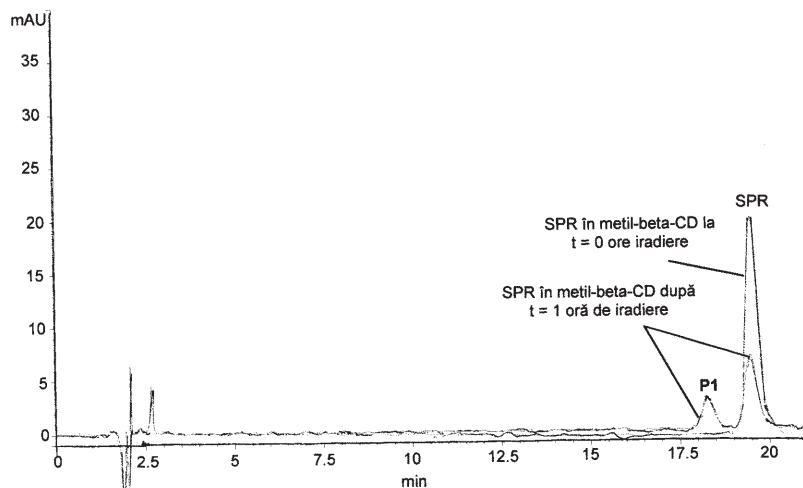


Fig. 5. Cromatogramele HPLC-UV ale unei soluții 1 mg/mL SPR în prezență de metil- β -CD 20 mM obținute după 0 ore, respectiv, 1 oră de expunere la radiații UV

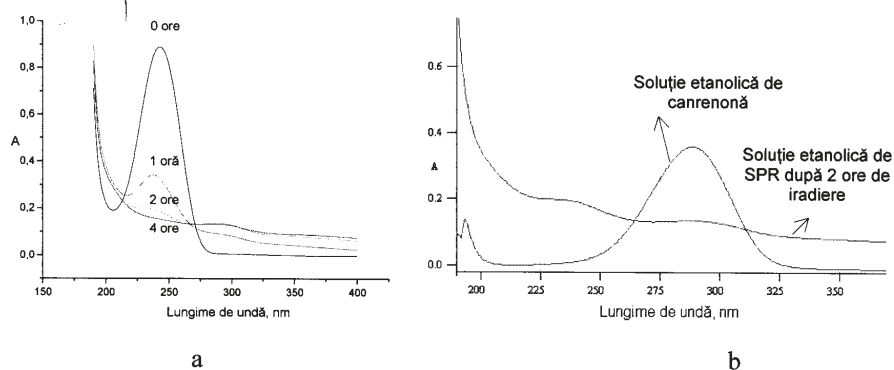


Fig. 6. a. Spectrele în UV ale soluției etanolice de SPR 1 mg/mL măsurate la diferenți timpi de expunere la radiații UV după diluare de 100 de ori cu apă, b. Reprezentare comparativă a spectrului în UV al soluției etanolice 10 μ g/mL canrenonă și cel al soluției etanolice 1 mg/mL SPR după 2 h de expunere la radiații UV și diluare de 100 de ori cu apă.

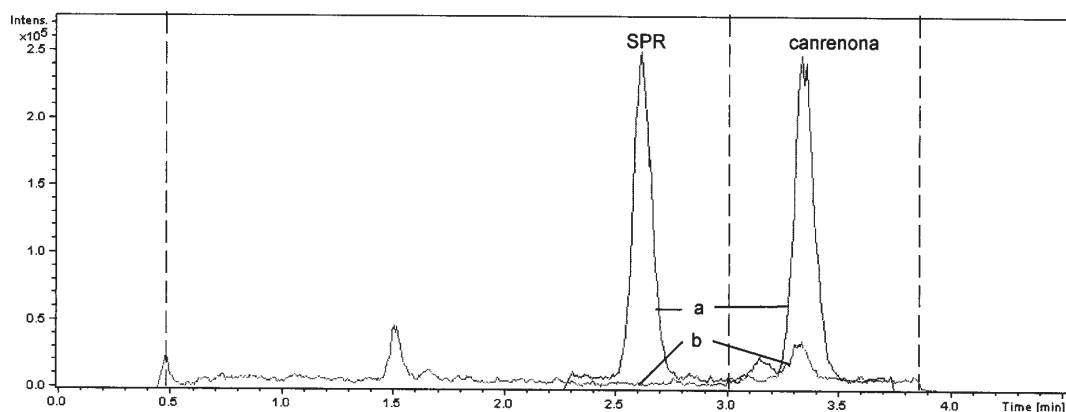


Fig. 7. Cromatogramele HPLC-MS ale: a- soluției amestec standard de SPR și canrenonă cu concentrațiile fiecăre 10 μ g/mL în apă; b- soluției etanolice 1 mg/mL SPR după 4 h de expunere la radiații UV.

concentrației spironolactonei în timp, formarea cel puțin a unui produs de degradare 7- α -tiospirolactona, degradarea fiind mai accentuată în prezența metil- β -CD. După 4 h nu se mai detectează SPR în nici una dintre probe, lucru confirmat și prin analiza HPLC-MS aplicată (condițiile de analiză HPLC-MS au fost stabilite încât să permită detecția specifică a SPR și canrenonei în probe cu concentrații < 1 ng/mL). Se observă din cromatograma din figura 7 faptul că după patru ore SPR nu se mai poate detecta, iar canrenona este în cantități foarte mici.

Concluzii

Spironolactona este stabilă la 22°C în soluție etanol : apă = 1 : 1 și în soluție de metil- β -CD cel puțin 24 h. Ciclodextrinele favorizează solubilitatea spironolactonei, dar unele grăbesc degradarea acesteia, explicabilă prin faptul că dezacetilarea spironolactonei este favorizată de prezența grupărilor hidroxil din pozițiile 2, 6, blocate în cazul metil- β -CD.

Acțiunea simultană a temperaturii și radiațiilor UV accelerează degradarea spironolactonei chiar și în soluție

de metil- β -CD. S-a demonstrat că prin expunere la lumină UV, soluțiile de spironolactonă în prezența metil- β -CD, respectiv în soluție etanolică, se degradează inițial la 7 α -tiospirolactonă și canrenonă, dar procesele devin complexe cu creșterea gradului de iradiere, aceste aspecte nefiind abordate până acum din câte cunoaștem.

Prin urmare soluția de spironolactonă în amestec etanol : apă = 1 : 1, raport volumic, poate fi o formulare farmaceutică simplă și cu o stabilitate bună utilizabilă în tratamentul alopeciei la bărbați, cu recomandarea protejării prin acoperire a zonei tratate.

Bibliografie

1. TOSTI, A., CAMACHO-MARTINEZ, F., DAWBER, R., J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol., **12**, nr. 3, 1999, p. 205.
2. KATA, M., SELMECZI, B., J. Incl. Phenom., **5**, 1987, p. 39.
3. MARTIN DEL VALLE, E.M., Proc. Biochem., **39**, 2004, p. 1033.
4. RYTTING, E., LENTZ, K., CHEN, X.Q., QIAN, F., VENKATESH, S., AAPS-J., **7**, nr. 1, 2005, p. E78.
5. PRAMAR, Y., DAS GUPTA, V., BETHEA, C., J. Clin. Pharm. Ther., **17**, nr. 4, 1992, p. 245.

6. CHALLA, R., AHUJA, A., ALI, J., KHAR, R.K., AAPS Pharm. Sci. Tech., **6**, nr. 2, 2005, p. E329
7. KAUKONEN, A.M., LENNERNAS, H., MANNERMAA, J.-P., J. Pharm. Pharmacol., **50**, nr. 6, 1998, p. 611.
8. PRAMAR, Y., GUPTA, V.D., J. Pharm Sci., **80**, nr. 6, 1991, p. 551.
9. SALGADO, A., ROSA, L., DUARTE, A., ALMEIDA, A., Eur. J. Hosp. Pharm. Sci., **11**, nr. 3, 2005, p. 68.

10. KAUKONEN, A.M., VUORELA, P., VUORELA, H., MANNERMAA, J.-P., J. Chrom. A, **797**, 1998, p. 271.
11. CHENA, H., WANG, Y.F., YANG, Z.D., LI, Y.C., J. Pharm. Biomed. Anal., **40**, 2006, p. 1263
12. KAUKONEN, A.M., KILPELAINEN, I., MANNERMAA, J.-P., Int. J. Pharm., **159**, 1997, p. 159

Intrat în redacție: 29.06.2007