

Validación de un método analítico por cromatografía de gases para la cuantificación de memantina clorhidrato

Validation of an Analytical Method by Gas Chromatography for the Quantification of Memantine Hydrochloride

Wilmer Tamayo González^{1*} <https://orcid.org/0000-0001-9845-4438>

Natalia Afanasjeva¹ <https://orcid.org/0000-0002-6184-1458>

¹Universidad del Valle. Cali, Colombia.

*Autor para la correspondencia: wilmer.tamayo@correounivalle.edu.co

RESUMEN

Introducción: La enfermedad de Alzheimer es la primera causa de demencia en el mundo y afecta al cerebro humano de forma irreversible; para su tratamiento se emplea el medicamento memantina clorhidrato en las etapas moderada y grave.

Objetivo: Validar un método analítico para la cuantificación de memantina clorhidrato con el fin de obtener resultados seguros y confiables en condiciones del clima tropical húmedo aplicando modificaciones.

Métodos: Se empleó un método por cromatografía de gases con detector de ionización de llama, columna de 50 m x 0,32 mm, relleno G27 de 0,52 µm, helio como gas de arrastre con velocidad de flujo de 4,0 mL/min, temperatura del inyector a 220 °C, temperatura del detector a 300 °C, volumen de inyección de 1 µL. La memantina clorhidrato se disolvió en un medio básico para su posterior extracción con hexano y se cuantificó con adamantano como estándar interno. Se evaluaron los parámetros de especificidad, linealidad, exactitud, precisión y robustez.

Resultados: El método fue lineal, con un coeficiente de correlación de 0,999942, un coeficiente de determinación de 0,999885 y un coeficiente de variación de los factores de respuesta de 0,7 %, las varianzas no difirieron significativamente en el intervalo de concentraciones evaluados en la linealidad y exactitud, en este último se obtuvo una cantidad promedio recuperada de memantina clorhidrato de 101,4 %, el coeficiente de variación de la precisión instrumental fue de 0,7 % y la precisión intermedia cumplió según los criterios establecidos con una significancia de 0,05. En la especificidad no se observaron interferencias de picos adicionales en el tiempo de retención del pico principal del principio activo y ninguna de las variaciones realizadas al método analítico demostraron ser críticas.

Conclusiones: El método analítico validado por cromatografía de gases para la cuantificación de la memantina clorhidrato, con las modificaciones realizadas respecto al método es específico, lineal, exacto, preciso y robusto en el intervalo de concentraciones utilizadas para su aplicación en el control de la calidad en condiciones del clima tropical húmedo.

Palabras clave: validación; memantina clorhidrato; cromatografía de gases.

ABSTRACT

Introduction: Alzheimer's disease is the leading cause of dementia in the world and affects the human brain irreversibly; the drug memantine hydrochloride is used for its treatment in the moderate and severe stages.

Objective: To validate an analytical method for the quantification of memantine hydrochloride in order to obtain safe and reliable results in humid tropical climate conditions by applying modifications.

Methods: A gas chromatographic method with flame ionization detector, 50 m x 0.32 mm column, 0.52 μm G27 packing, helium as carrier gas with flow rate of 4.0 mL/min, injector temperature at 220 °C, detector temperature at 300 °C, injection volume of 1 μL was used. Memantine hydrochloride was dissolved in basic medium for subsequent extraction with hexane and quantified with adamantane as internal

standard. The parameters of specificity, linearity, accuracy, precision and robustness were evaluated.

Results: The method was linear, with a correlation coefficient of 0.999942, a coefficient of determination of 0.999885 and a coefficient of variation of the response factors of 0.7%, the variances did not differ significantly in the range of concentrations evaluated in linearity and accuracy, in the latter an average recovered amount of memantine hydrochloride of 101.4% was obtained, the coefficient of variation of the instrumental precision was 0.7% and the intermediate precision met according to the established criteria with a significance of 0.05. In specificity, no additional peak interferences were observed in the retention time of the main peak of the active principle and none of the variations made to the analytical method proved to be critical.

Conclusions: The validated analytical method by gas chromatography for the quantification of memantine hydrochloride, with the modifications made with respect to the method is specific, linear, accurate, precise and robust in the range of concentrations used for its application in quality control in humid tropical climate conditions.

Keywords: validation; memantine hydrochloride; gas chromatography.

Recibido: 09/07/2022

Aceptado: 09/04/2023

Introducción

En el informe mundial⁽¹⁾ sobre alzhéimer se estimó que habría más de 50 millones de personas con demencia en todo el mundo para 2019, una cifra que aumentará a 152 millones para 2050. Actualmente, la enfermedad de Alzheimer (EA) es la primera causa de demencia en el mundo, se caracteriza por el declinar progresivo e irreversible de funciones cognitivas y de la conducta humana que afecta la calidad

de vida de los pacientes, familiares y cuidadores.^(2,3) Para su tratamiento se emplea la memantina clorhidrato en las etapas moderada y grave,⁽²⁾ la cual es, además, un potencial medicamento en el trastorno del espectro autista pediátrico (TEA).⁽⁴⁾

A través de los años, la industria farmacéutica ha ganado un papel de vital importancia en la sociedad, lo cual le impone a la vez una máxima responsabilidad social por los medicamentos de uso humano. La necesidad de métodos analíticos confiables de los laboratorios constituye una exigencia desde el punto de vista normativo a nivel nacional e internacional,⁽⁵⁾ para lo cual la validación es una etapa fundamental, porque es la forma de obtener pruebas documentadas de que un método ofrece consistentemente resultados exactos, precisos y reproducibles.⁽⁶⁾ Las validaciones se hacen con frecuencia para ingredientes activos, productos terminados, ensayos de disolución e impurezas⁽⁷⁾ por diferentes técnicas analíticas, tales como espectrofotometría UV-Vis,⁽⁸⁾ potenciometría, cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) y cromatografía líquida/gaseosa acopladas a diferentes detectores. Estas últimas aprovechan la gran selectividad del método; algunos ejemplos: desarrollo de un método analítico para la determinación de sustancias relacionadas y productos de degradación de cabotegravir utilizando principios analíticos de calidad por diseño,⁽⁹⁾ un método verde de cromatografía de capa delgada de alto rendimiento para la determinación de cafeína en bebidas energéticas comerciales y formulaciones.^(10,11)

El objetivo de este trabajo fue validar un método analítico para la cuantificación de memantina clorhidrato con el fin de obtener resultados seguros y confiables en condiciones del clima tropical húmedo aplicando modificaciones.

Métodos

La validación del método tuvo como base las recomendaciones para análisis de la materia prima descrita en la farmacopea (USP-NF2021)⁽¹²⁾ con algunas modificaciones al procedimiento. Se utilizó un método por cromatografía de

gases/FID, columna de 50 m x 0,32 mm, relleno G27 de 0,52 μm , helio como gas de arrastre con velocidad de flujo de 4,0 mL/min, temperatura del inyector a 220 °C, temperatura del detector a 300 °C, volumen de inyección de 1 μL , relación de partición 1:50 y temperatura del horno: 50 °C a 5 °C/min, 145 °C a 10 °C/min y 250 °C por 20 min. Se evaluó la solución estándar para la aptitud del sistema: asimetría máxima 2,0 para memantina y adamantano y desviación estándar relativa de no más de 2,0 % para el cociente entre las áreas de los picos de memantina y adamantano. Se prepararon estándares de referencia y muestras de memantina HCl a una concentración de trabajo de 4,0 mg/mL en balón de 50 mL, se disolvió en hidróxido de sodio 1 N, luego se extrajo la memantina base agregando el compuesto adamantano en hexano como estándar interno con una concentración de 4,0 mg/mL, se tapó y agitó durante 25 minutos en agitador mecánico a una velocidad de 600 rpm, se dejó que las capas de las fases se separarán. Posteriormente se deshidrataron 10 mL de la capa superior pasándolos a través de una jeringa que contenía 1 g de sulfato de sodio anhidro. Se empleó el filtrado transparente para su inyección de 1 μL en el cromatógrafo de gases Agilent 7890A.

Las modificaciones realizadas respecto al método oficial fueron:

- Reducción de la cantidad de estándar de referencia (60 mg/15 mL) necesaria sin modificar la concentración final.
- Cambio del tipo y tiempo de agitación para la extracción de la memantina.
- Forma de deshidratar la fase orgánica posterior a la extracción.

Validación del método analítico

Especificidad: Se analizó el ingrediente farmacéutico activo (IFA) muestra de control de memantina HCl sin degradar, muestras sometidas a condiciones de degradación forzada, como hidrólisis ácida (HCl 1 N, 60 °C por 60 min), hidrólisis alcalina (NaOH 1 N, 60 °C por 60 min), oxidación (H_2O_2 al 30 %, 60 °C por 60 min), fotólisis (254 nm por 24 horas) y sus respectivos diluentes sometidos a iguales condiciones de degradación. Debido a que no se observó degradación a las condiciones iniciales,

se prepararon nuevas muestras sometiéndolas a condiciones de degradación más intensas para la hidrólisis alcalina (NaOH 3 N, 80 °C por 120 min) y oxidación (H₂O₂ al 30 %, 80 °C por 120 min) junto con sus respectivos diluentes. Se determinó el contenido de memantina HCl en porcentaje y la posible generación de productos de degradación o impurezas que interfirieran en su cuantificación.

Linealidad del sistema: Se prepararon muestras de memantina HCL para obtener con un intervalo cinco concentraciones: 50, 75, 100, 125 y 150 % de la concentración de trabajo analizándose por triplicado cada nivel de concentración. La linealidad se estableció por medio de la regresión lineal para obtener la ecuación de la recta de las respuestas obtenidas a las diferentes concentraciones de trabajo, se determinó el coeficiente de correlación, coeficiente de determinación, análisis de la varianza de la regresión lineal (ANOVA) y test de linealidad.

Exactitud: Para el estudio de este parámetro se analizaron muestras de memantina HCL por triplicado en niveles equivalentes al 75, 100 y 125 % de la concentración de trabajo o del valor teórico declarado, se determinó el promedio del porcentaje de recuperación por cada uno de los niveles de concentración, coeficiente de variación (CV) por nivel y el CV global, además se realizó análisis de la varianza para determinar si el factor de concentración tiene alguna influencia en los resultados obtenidos.

Precisión del sistema: Se analizó una solución estándar a una concentración de trabajo de 4,0 mg/mL y se inyectó 6 veces en el equipo cromatógrafo de gases/FID para hallar la variabilidad de respuesta del equipo instrumental, se determinó el CV.

Precisión intermedia: Se realizó la misma cuantificación por dos analistas, en dos días diferentes, en el mismo laboratorio. Cada analista preparó estándares de referencia por duplicado y 6 muestras de memantina HCL con concentración real de 4,0 mg/mL. De los resultados, se determinó el promedio de los porcentajes de memantina HCL, los CV individuales y globales de análisis para llevar a cabo el análisis de la varianza.

Robustez: Se realizaron variaciones razonables en las condiciones cromatográficas del método (ver tabla 1). El estudio de robustez se llevó a cabo modificando un factor a la vez y las muestras se analizaron por triplicado.

Tabla 1 - Cambios propuestos para evaluar la robustez del método cromatográfico

Variables a analizar	Valores por debajo de parámetros	Valores por encima de parámetros
Temperatura del horno	40 °C a 5 °C/min, 145 °C a 10 °C/min y 200 °C por 23 min	60 °C a 5 °C/min, 145 °C a 10 °C/min y 300 °C por 17 min
Velocidad de flujo	3,5 mL/min	4,5 mL/min
Relación de partición	1:30	1:70

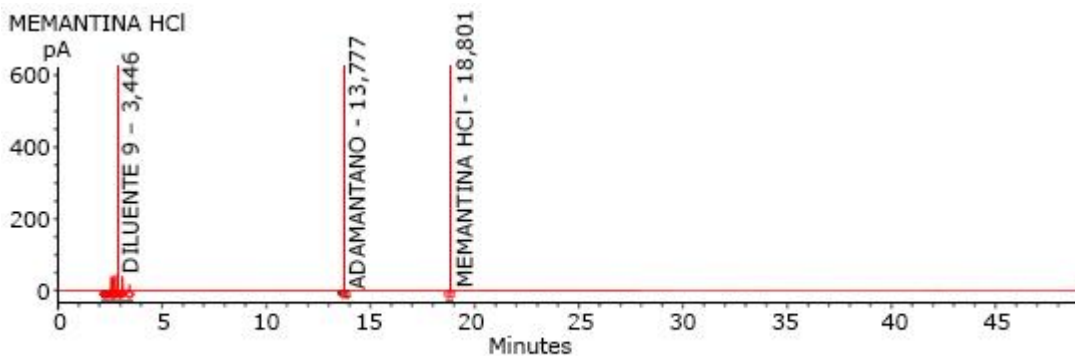
Se determinó el contenido de memantina clorhidrato y su CV; asimismo, se llevó a cabo el análisis de la varianza a cada una de las variaciones propuestas y se verificaron los requisitos de aptitud del sistema en funcionamiento.

Resultados

Especificidad

En los cromatogramas obtenidos ninguna de las señales correspondiente al diluyente de preparación de muestras, estándar interno, hexano presentaron señal al tiempo de retención de la memantina. No se presentaron picos correspondientes a productos de degradación o impurezas en todo el rango evaluado que interfirieran con su cuantificación, la metodología analítica fue capaz de identificar la molécula inalterada. En la figura 1 se muestran los cromatogramas de gases correspondientes al estándar de referencia, IFA control y su diluyente.

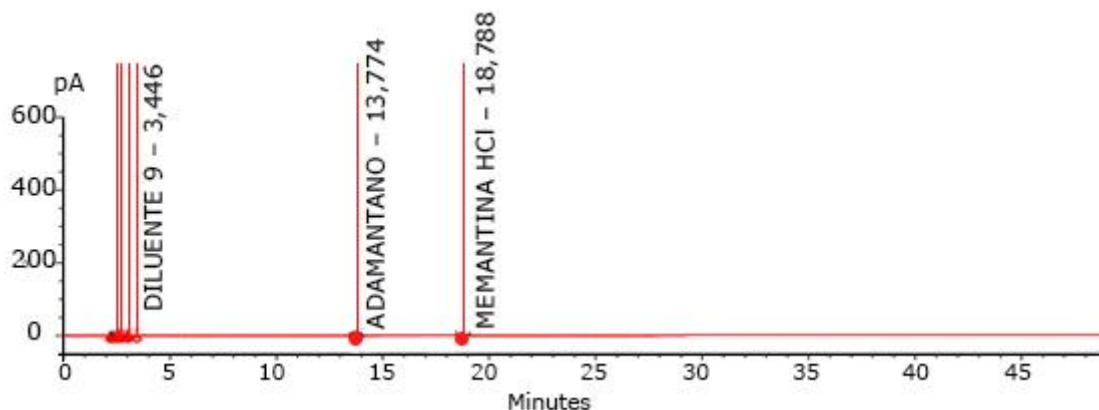
A)



Sample Name	vial	Inj	RT	Area	Height	Peak Width (sec)	Threshold ($\mu\text{V}/\text{sec}$ or μV)
Estandar 1	531	1	18,80	809,39	299,0	2,12	0,06

Sample Name	N	USP Resolution	K Prime	Tailing	Peso muestra	Peso de API	Potencia STD
Estandar 1	1056958	70,4	8,0	1,0	1,0000	60,0000	99,700

B)



C)

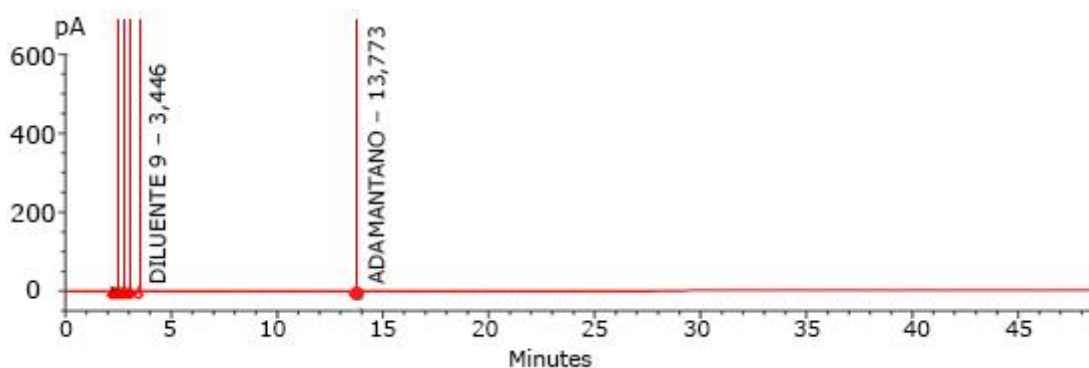
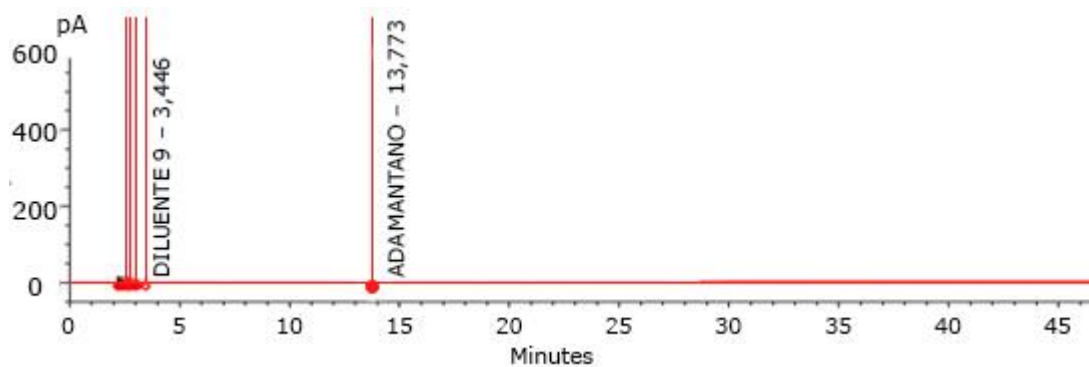


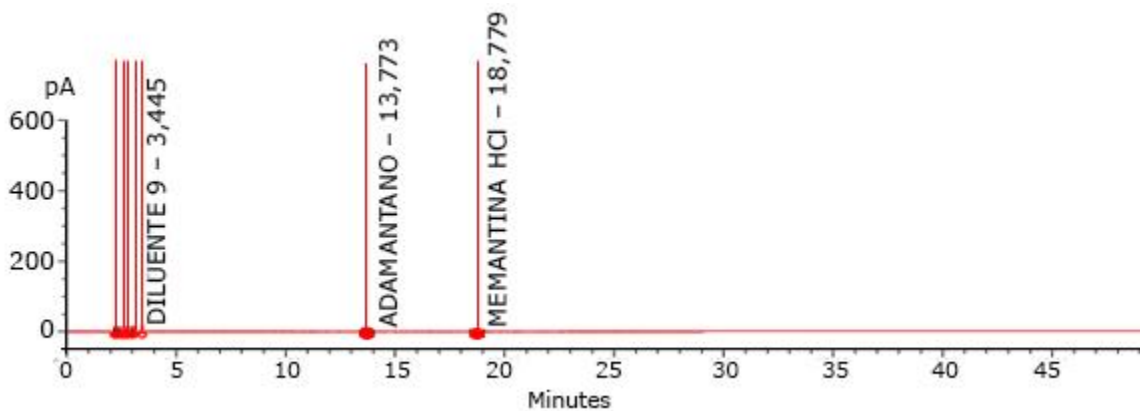
Fig. 1 - Cromatogramas de gases de: A) estándar de referencia, B) IFA control, C) diluyente.

Los resultados obtenidos de las muestras sometidas a degradación fueron: 100,1 % y 99,5 % para la hidrólisis alcalina; 100,1 % y 100,3 % para oxidación; 100,3 % para fotólisis y 0 % para hidrólisis ácida. En la figura 2 se muestran los cromatogramas de gases de las muestras de memantina HCl sometidas a condiciones de degradación forzada: hidrólisis ácida y alcalina, oxidación y fotólisis.

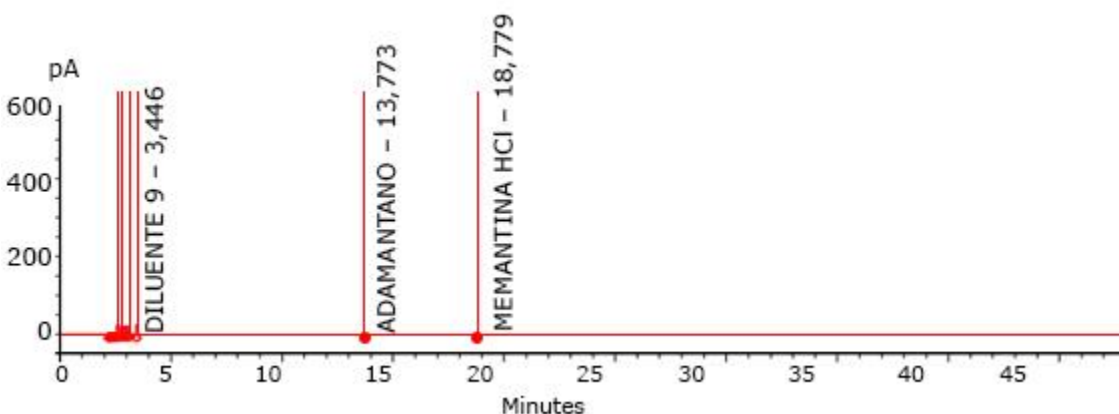
D)



E)



F)



G)

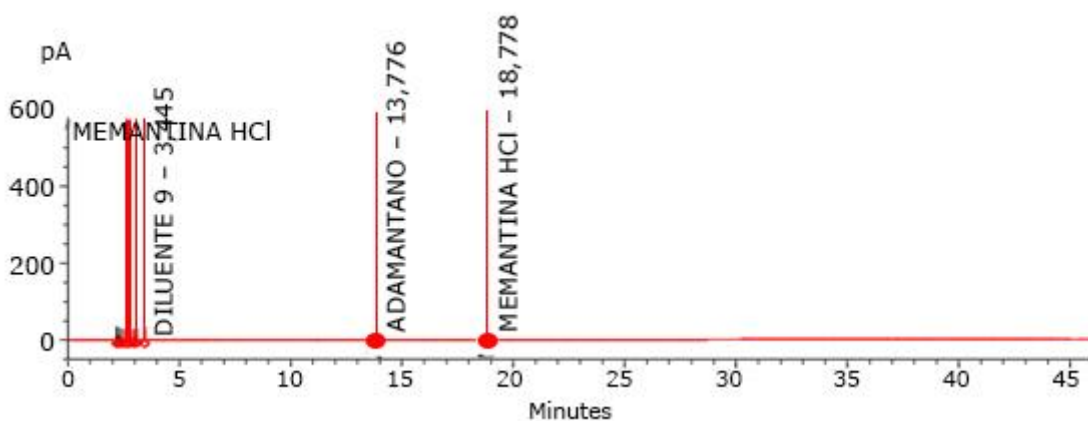


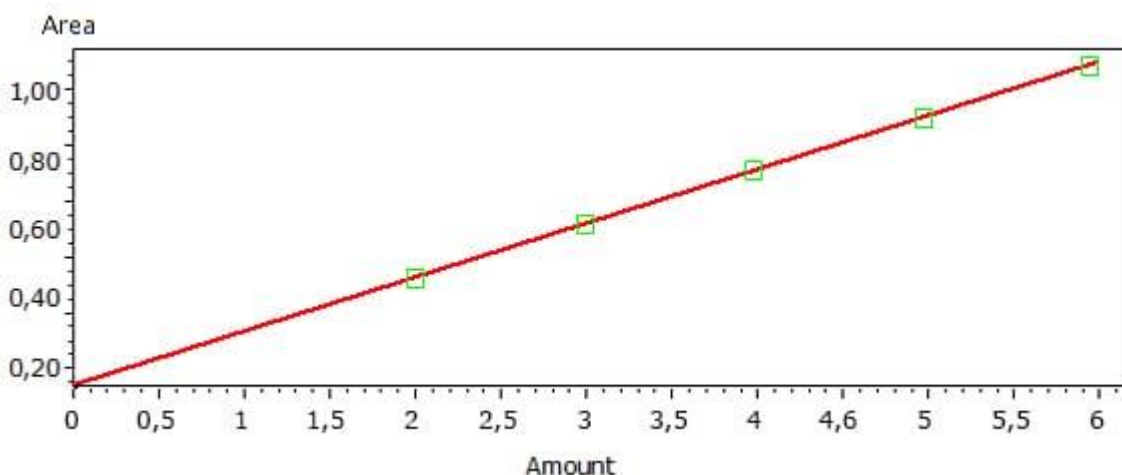
Fig. 2 - Cromatogramas de gases correspondientes a las muestras de memantina HCl sometidas a:

D) hidrólisis ácida, E) hidrólisis alcalina, F) oxidación y G) fotólisis.

Linealidad del sistema

En el estudio del parámetro de la linealidad del sistema (fig. 3A) se obtuvo la recta de regresión lineal $Y = 0,184x - 0,00924$, con coeficiente de correlación = 0,999942, coeficiente de determinación = 0,999885 y un CV de los factores de respuesta = 0,7 %. El gráfico de distribución de los residuos (fig. 3B) mostró una dispersión aleatoria alrededor de la línea del cero, los valores experimentales de t de Student para el intercepto y la pendiente (4,00 y 336,11, respectivamente) fueron mayores que el valor tabulado ($t_{tab} = 2,16$), el valor de Cochran $G_{exp} = 0,32$ fue menor al $G_{tab} = 0,68$ y el valor de Fisher $F_{exp} = 112972,37$ fue mayor al $F_{tab} = 4,67$, todo con una significancia de 0,05.

A)



B)

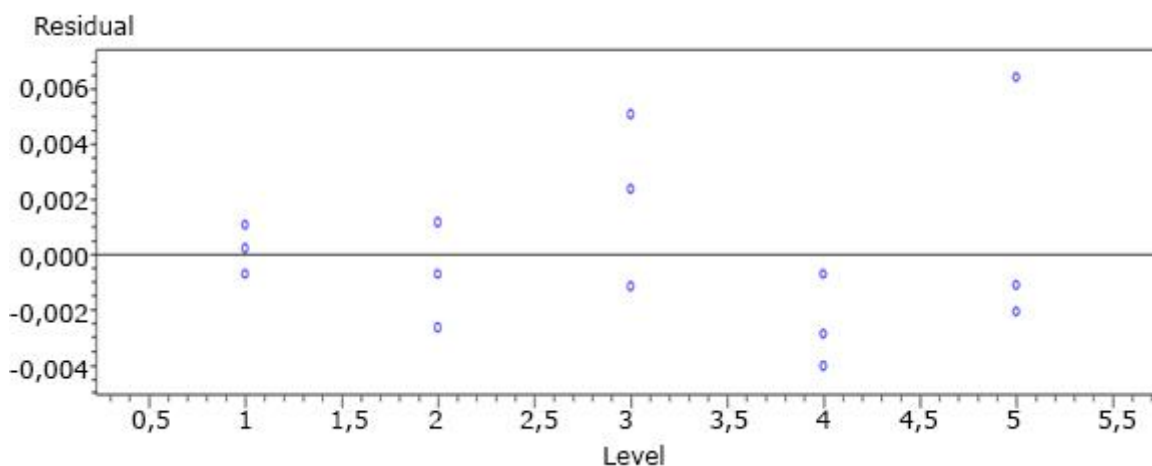


Fig. 3 - A) curva de calibración de la linealidad del sistema, B) distribución de los residuos.

Exactitud

En la tabla 2 se presentan los resultados del estudio de exactitud de medición.

Tabla 2 - Datos experimentales obtenidos para la determinación de exactitud del método

Nivel de concentración	Cantidad promedio recuperada de memantina HCl, %	Promedio total (%) / CV %	Promedio nivel (%)
75 %	101,2	101,4 / 0,3	75,9
100 %	101,4		101,4
125 %	101,6		127,1
H ₀ : la varianza es homogénea	Valor <i>p</i> : 0,82	Valor <i>p</i> referencia (Significancia): 0,05	
	Valor Cochran: 0,48	Valor Cochran de referencia: 0,87	
H ₀ : el % recuperado promedio en todos los niveles es igual	Valor <i>p</i> : 0,16	Valor <i>p</i> referencia (Significancia): 0,05	
	Valor F: 2,56	Valor F de referencia: 5,14	

Precisión del sistema y precisión intermedia

La precisión instrumental determinada por el CV de las áreas de memantina HCl fue de 0,7 %. En la precisión intermedia se obtuvo para cada analista un promedio de 101,5 % y 101,2 % con CV de 0,6 % y 0,3 %, respectivamente; el promedio de las 12 muestras de memantina HCl fue de 101,3 % y un CV de 0,5 %, los valores experimentales de *p* y Fisher fueron 0,26 y 1,41, respectivamente frente a los valores tabulados de 0,05 y 4,96 con una significancia de 0,05.

Robustez

En la determinación de robustez, los resultados del contenido de memantina HCl estuvieron dentro del rango (98,0 %-102,0 %) y su promedio fue de 101,3 %, con un CV de 0,3 %; los valores experimentales de Fisher fueron menores que 18,51, los

requisitos de aptitud del sistema se cumplieron en cada una de las variaciones de las condiciones cromatográficas del método analítico.

Discusión

En la evaluación de la especificidad las respuestas de las muestras de memantina HCl no presentaron cambios considerables aun cuando se sometieron a condiciones de degradación más fuertes en medio alcalino y de oxidación. Con los resultados obtenidos fue posible determinar que la molécula de memantina HCl es bastante estable a las diferentes condiciones de degradación a la que fue sometida, no hay interferencia con los picos de interés ni se presentan señales adicionales en los cromatogramas en todo el rango de estudio. En las muestras de la hidrólisis ácida no se observa la señal correspondiente a memantina, debido a que la amina se protona en el ácido clorhídrico acuoso, cambiando su solubilidad y formándose la sal de la amina, la cual se disuelve en la fase acuosa.⁽¹³⁾ La resolución entre los dos picos de interés es de 70, lo que indica que el método usado tiene la capacidad cromatográfica de separar las moléculas. En cromatograma del diluyente no se detecta señal al tiempo de retención de la memantina, lo cual descarta un error sistemático en cada análisis a causa del diluyente utilizado. Con los resultados obtenidos se determina que la respuesta del método analítico es únicamente proporcionada por la memantina HCl y el adamantano, sin interferencias en la señal a causa de productos de degradación.

Con los valores de coeficientes de correlación y de determinación (0,999942 y 0,999885) obtenidos en la linealidad se asegura que hay un alto grado de relación proporcional entre la concentración de la memantina HCl y el cociente de las áreas obtenidas como respuesta del equipo instrumental (fig. 3A). El coeficiente de variación de los factores de respuesta demuestra que estos son semejantes entre sí en todo el intervalo de estudio. El análisis de los residuos (fig. 3B) sugiere una distribución normal sin ningún tipo de tendencia y con una dispersión aleatoria alrededor de la línea del cero, ello indica que el ajuste por mínimos cuadrados es el

mejor modelo para describir el comportamiento de los datos, esto último corroborado por medio del análisis de varianza de la regresión lineal. La evaluación de la pendiente mediante el test de t de Student permite comprobar que existe una pendiente significativamente distinta de cero y su respuesta aumenta de manera proporcional con el aumento de la concentración, para el intercepto se rechaza la hipótesis nula, lo cual indica que a este nivel de significancia, el intercepto presenta una diferencia significativa o es estadísticamente diferente de cero. El cumplimiento del test de Cochran deja claro que las varianzas no difieren significativamente a lo largo del intervalo de concentraciones.

La homogeneidad de varianzas no difiere significativamente entre los niveles de estudio para la exactitud, con el tratamiento estadístico se determina que el promedio del porcentaje recuperado en todos los niveles es igual y que el factor de concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

La repetibilidad instrumental demuestra que el sistema instrumental opera con una precisión adecuada y que al momento de cuantificar los resultados son confiables. En la precisión intermedia no se observa una diferencia significativa de los porcentajes promedios de memantina HCl de cada analista, el conjunto de resultados permite asegurar que el método analítico es preciso cuando se aplica en diferentes días de análisis y por distintos analistas.

El promedio del contenido de las muestras de memantina HCl de las modificaciones realizadas en la robustez junto con el coeficiente de variación avalan el hecho que ninguna de las variaciones realizadas son críticas, por lo que no se consideran parámetros sensibles y se puede trabajar en el rango de las modificaciones de estudio sin que se vea afectada la reproducibilidad del método y donde se mantiene de igual forma la aptitud del sistema.

En conclusión, el método analítico validado por cromatografía de gases para la cuantificación de la memantina HCl con las modificaciones realizadas respecto al método es específico, lineal, exacto, preciso y robusto en el intervalo de concentraciones para su aplicación en control calidad en condiciones del clima tropical húmedo.

Referencias bibliográficas

1. Alzheimer's Disease International. Londres: Alzheimer's Disease International. Informe mundial sobre el Alzheimer 2019: Actitudes hacia la demencia. 2019 [acceso 15/06/2022]. Disponible en: <https://www.alzint.org/u/WorldAlzheimerReport2019-Spanish-Summary.pdf>
2. Gil MJ, Manzano MS. Tratamiento sintomático de la demencia: papel de la memantina. (Spanish). *Kranion*. 2021 [acceso 15/06/2022];16(1):24-9. Disponible en: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edb&AN=153350206&lang=es&site=eds-live>
3. Zúñiga T, Yescas P, Fricke I, González M, Ortega A, López M. Pharmacogenetic studies in Alzheimer disease. *Neurologia*. 2022;37(4):287-303. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2018.03.022>
4. Hardan AY, Hendren RL, Aman MG, Robb A, Melmed RD, Andersen KA, et al. Efficacy and safety of memantine in children with autism spectrum disorder: results from three phase 2 multicenter studies. *Autism*. 2019;23(8):2096-111. DOI: <https://doi.org/10.1177/1362361318824103>
5. Yuwono M, Indrayanto G. Validation of chromatographic methods of analysis. Profiles of drug substances, excipients and related methodology. 2005;32:243-59. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0099-5428\(05\)32009-0](https://doi.org/10.1016/S0099-5428(05)32009-0)
6. McMillan J. Principles of analytical validation. En: Ciborowski P, Silberring J, editores. *Proteomic profiling and analytical chemistry*. 2a ed. Elsevier; 2016. p. 239-51. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63688-1.00013-6>
7. Rojas J, Sierra N. *Como validar sus metodologías analíticas*. Bogotá: Editorial Papel y plástico impresores Ltda; 2017.
8. Delgado BS, López NL, Castro V, Zuñiga O. Validation of three analytical methods for quantification of acetaminophen by UV spectrophotometry. *Ars Pharmaceutica*.

2022 [acceso 15/06/2022];63(2):152-65. Disponible en:
<https://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/21983>

9. Kovač L, Časar Z, Trdan T, Roškar R. Development of an analytical method for determination of related substances and degradation products of cabotegravir using analytical quality by design principles. ACS Omega. 2022;7(10):8896-905. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c07260>

10. Foudah AI, Shakeel F, Salkini MA, Alshehri S, Ghoneim MM, Alam P. A green high-performance thin-layer chromatography method for the determination of caffeine in commercial energy drinks and formulations. Materials. 2022;15(9):2965. DOI: <http://doi.org/10.3390/ma15092965>

11. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Cromatografía de gases. En: Fernández C, editora. Principios de Análisis Instrumental. 5a ed. Madrid: McGraw Hill; 2001. p. 765-66.

12. The United States Pharmacopeial Convention. Farmacopea de los Estados Unidos. USP-NF2021. Rockville: Mack Printing; 2021.

13. Wade LG. Aminas. En: López G, editora. Química orgánica. 7a ed. Vol. 2. México: Pearson; 2011. p. 882-84.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Wilmer Tamayo González, Natalia Afanasjeva.

Curación de datos: Wilmer Tamayo González.

Análisis formal: Wilmer Tamayo González.

Investigación: Wilmer Tamayo González.

Metodología: Natalia Afanasjeva.

Software: Wilmer Tamayo González.

Supervisión: Natalia Afanasjeva.

Validación: Wilmer Tamayo González.

Visualización: Natalia Afanasjeva, Wilmer Tamayo González.

Redacción-borrador original: Wilmer Tamayo González, Natalia Afanasjeva.

Redacción-revisión y edición: Wilmer Tamayo González, Natalia Afanasjeva.