

Sulfato de Neomicina: Efecto de los Iones Fosfato, Borato e Hidróxido sobre su Estabilidad

HARUTIUN ERGÜVEN y ANTONIA MASCARO de PICCOLI

*Departamento de Química Analítica, Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA),
Junín 956, Buenos Aires 1113, Argentina*

RESUMEN. Se estudió el efecto de los iones fosfato, borato e hidróxido sobre la estabilidad de soluciones de sulfato de neomicina a pH 7,0 y la influencia de diferentes concentraciones de ion fosfato en soluciones de fuerza iónica constante ($\mu = 0,6$). Para la cuantificación del sulfato de neomicina se empleó la técnica de complejación con amaranto y posterior lectura a 520 nm, mientras que el oscurecimiento de las soluciones se determinó directamente por mediciones espectrofotométricas a 450 nm. Se observó una máxima degradación por efecto del ion fosfato, siguiéndole luego el borato; el hidróxido resultó tener el menor efecto degradante. Paralelamente, por cromatografía en capa fina se detectaron dos productos de degradación ($R_f = 0,35$ y $0,46$).

SUMMARY. "Neomycin sulfate: Effect of Phosphate, Borate and Hydroxyde Ions on its Stability". The effect of phosphate, borate and hydroxyde ions on the stability of neomycin sulfate at pH 7.0 and the influence of different concentrations of phosphate ions in solutions at constant ionic strength ($\mu = 0.6$) were studied. Neomycin sulfate was quantified by complexation with amaranth and measured at 520 nm, while the discolouration of solutions was measured spectrophotometrically at 450 nm. A major degradation for phosphate ions was observed while hydroxyde ions had a minimum effect. By TLC, two degradation products were detected at $R_f = 0.35$ and 0.46 .

INTRODUCCION

La neomicina, antibiótico perteneciente al grupo de los aminoglucósidos, ha sido incorporada como sulfato en diversas formas farmacéuticas de uso tópico debido a su efectividad frente a la mayoría de los microorganismos Gram(-) y muchos Gram(+)¹.

El sulfato de neomicina es compati-

ble con la mayoría de los excipientes que comúnmente se emplean en las formas farmacéuticas² y además forma complejos estables con diferentes sustancias³⁻⁵.

Su estabilidad ha sido ampliamente investigada en diversas preparaciones^{1, 6-13} y se ha encontrado que es relativamente estable, en solución acuosa, en un rango de pH 2,0 a 9,0 como mínimo durante

PALABRAS CLAVE: Estabilidad; Fuerza iónica; Efecto de Fosfato; Efecto de Borato; Efecto de Hidróxido.

KEY WORDS: Neomycin sulfate; Stability; Ionic strength; Phosphate effect; Hydroxyde effect.

un año a temperatura ambiente. También se ha observado que sufre una degradación hidrolítica, dando en una primera etapa neamina y neobiosamina (disacárido compuesto por D-ribosa y neosamina)¹⁴, que posteriormente se transforma en furfural^{15, 16}, oscureciendo la preparación.

Tanaka *et al.*⁹ sostienen que la velocidad del cambio de color es pequeña tanto en medio ácido como alcalino, pero en la neutralidad ésta cambia fácilmente y es máxima a pH 7,0 (buffer de Clark-Lubs).

En este trabajo se estudió la estabilidad del sulfato de neomicina a pH 7,0 frente a iones monohidrógenofosfato, borato e hidróxido, siendo estos aniones los que frecuentemente se emplean como reguladores de pH en las formulaciones líquidas. Además se estudió el efecto de la concentración del ión monohidrógenofosfato sobre la estabilidad de la neomicina a fuerza iónica constante ($\mu = 0,6$).

Para la cuantificación se usó la técnica desarrollada por Mc Ginity y Hill¹⁷ con la adaptación de Hodges¹⁸. Paralelamente se siguió la degradación en capa fina. Usualmente la neomicina se cuantifica por el método microbiológico establecido por la FDA¹⁹. El alto grado de error inherente a las técnicas microbiológicas ya ha sido reportado por Mundell *et al.*²⁰. Existen además técnicas colorimétricas que utilizan ninhidrina²¹ u orcinol^{22, 23}, la reacción de Hantzsch²⁴ y entre las técnicas instrumentales modernas se encuentran la cromatografía gaseosa (GLC)²⁵, la cromatografía en capa fina (TLC) con detección videodensitométrica²⁶ y últimamente se emplean técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detectores fluorimétricos previa derivatización²⁷⁻²⁹.

MATERIAL Y METODOS

Drogas y Reactivos

Se ha empleado sulfato de neomicina (UpJohn) de calidad USP XXI estéril y drogas todas de alto grado analítico que cumplen las especificaciones de la F.A. VI edición.

Solución estándar: sulfato de neomicina 0,5% en agua.

Preparación de las muestras

Se prepararon diferentes soluciones de sulfato de neomicina con el agregado de fosfato disódico, borato de sodio e hidróxido de sodio, en todos los casos cantidad suficiente para tener un pH 7,0.

Fórmula I:

Sulfato de neomicina	0,50 g
Fosfato disódico anhidro	0,25 g
Agua destilada c.s.p.	100 ml

Fórmula II:

Sulfato de neomicina	0,50 g
Borato de sodio	0,14 g
Agua destilada c.s.p.	100 ml

Fórmula III:

Sulfato de neomicina	0,50 g
Hidróxido de sodio 0,1 M c.s.p. . . .	pH 7,0
Agua destilada c.s.p.	100 ml

Por otra parte se prepararon soluciones de neomicina de igual concentración que las anteriores, con el agregado de 0,25%-0,50%-1,25% y 2,50% de fosfato disódico y suficiente cantidad de cloruro de sodio para obtener soluciones de fuerza iónica constante ($\mu = 0,6$) en cada caso. Todas las soluciones se envasaron en ampollas para uso inyectable. Una parte se colocó en refrigerador y el resto se incubó en estufa a 65 °C por un período de 20 días. Periódicamente se retiraron muestras para su análisis.

Técnica de valoración

Solución buffer de pH 4,0: biftalato de potasio al 5%.

Solución colorante: amaranto al 0,2% en agua.

Solución estándar: sulfato de neomicina al 0,1%.

Solución muestra: 2 ml de muestra se diluyen con agua destilada en matraz aforado de 10 ml.

En matraces de 10 ml se colocan 1 ml de solución muestra y 1 ml de solución estándar, respectivamente. A cada matraz se le agregan 2 ml de solución buffer y 2 ml de solución colorante. Se lleva a volumen con agua destilada y se homogeneiza. Se deja reposar durante 15 minutos y se filtran las soluciones. Se toma 1 ml de cada filtrado y se diluye a 25 ml con agua destilada. Se homogeneiza y se lee a 520 nm frente a blanco de agua destilada.

Cromatografía en capa fina

Se usaron cromatofolios de silicagel F 254. Como solvente de desarrollo se empleó una mezcla en partes iguales de solvente A: etanol-cloroformo (5:2) y solvente B: amoníaco-ácido acético glacial (4:1). Se sembraron 50 µl de cada muestra sin diluir y posterior al desarrollo cromatográfico se revelaron las manchas con solución alcohólica de ninhidrina al 1% y 10 minutos de calentamiento a 110 °C. Paralelamente se corrió un estándar de igual concentración (resultados en Fig. 3).

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Analizando los valores obtenidos (cuadro 1) según las cinéticas que comúnmente siguen las drogas en solución³⁰, no se obtiene una reacción de degradación sencilla de pseudo primer orden. A-

demás en la Fig. 1 se pueden observar diferentes etapas, para cada formulación, con velocidades de degradación distintas.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado, con una desviación estándar relativa porcentual máxima de 1,6% (para n = 3).

Se ha detectado una mayor degradación en el caso de la fórmula I (fosfato), que se reduce en la fórmula II (borato), siendo la fórmula III (hidróxido) la de mayor estabilidad (cuadro y Fig. 1).

Tiempo (días)	% de sulfato de neomicina		
	Fórmula I	Fórmula II	Fórmula III
Inicial	100,0	100,0	100,0
3	93,8	96,1	96,9
5	90,1	92,9	94,6
7	88,3	91,0	93,3
10	86,2	90,4	92,6
14	82,7	86,1	91,3
20	80,5	82,8	90,6

Cuadro 1. Estabilidad del sulfato de neomicina a 65 °C en soluciones conteniendo iones fosfato, borato e hidróxido.

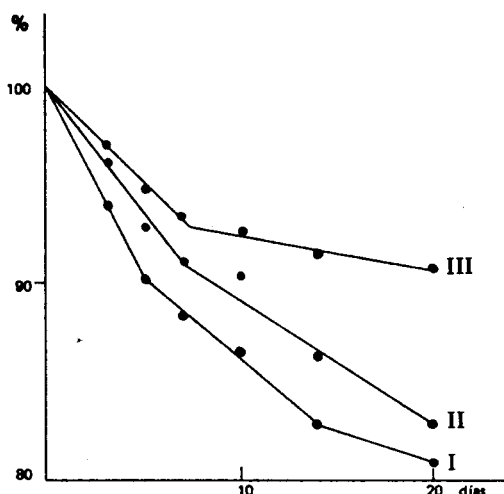


Figura 1. Estabilidad del sulfato de neomicina a 65 °C. I: fosfato disódico; II: borato de sodio; III: hidróxido de sodio.

Este resultado es coincidente también con el incremento del oscurecimiento que se va observando en las ampollas envejecidas: para los fosfatos > boratos > hidróxido y dentro de cada fórmula se observa el aumento de la coloración amarillo-parduzca en función del tiempo. El oscurecimiento desarrollado en las ampollas se comparó visualmente y por medidas espectrofotométricas a 450 nm (Fig. 2).

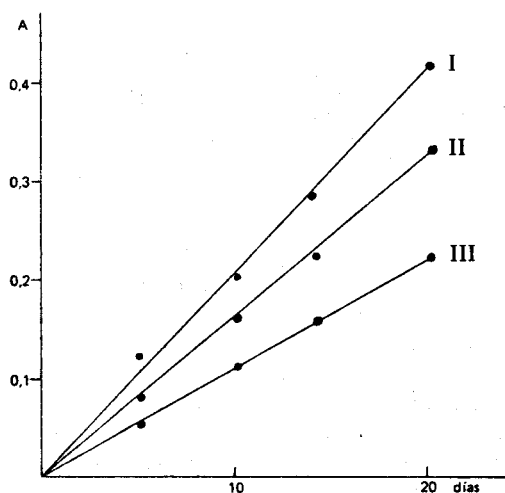


Figura 2. Oscurecimiento del sulfato de neomicina al 0,5% en presencia de: fosfato disódico (I); borato de sodio (II) e hidróxido de sodio (III).

Para analizar estadísticamente las diferencias entre las distintas fórmulas se usó el análisis de la varianza de dos factores fijos (fórmula y tiempo). Se obtuvieron diferencias altamente significativas entre las concentraciones medias correspondientes a las diferentes fórmulas, así como entre las concentraciones medias correspondientes a los distintos tiempos; $F = 391,96$ y $F = 310,81$ respectivamente, con una $P < 0,0001$. Además, la interacción fórmula-tiempo también resultó significativa con $F = 2,80$ para una $P < 0,05$.

Para las muestras envejecidas se ha detectado, por cromatografía en capa fina, una disminución de la mancha correspondiente al sulfato de neomicina de $R_f = 0,27$ y la aparición de dos manchas adicionales a $R_f = 0,35$ y $0,46$ que se incrementan en función del tiempo (Fig. 3). Esto es coincidente también con la degradación de la droga en la formulación.

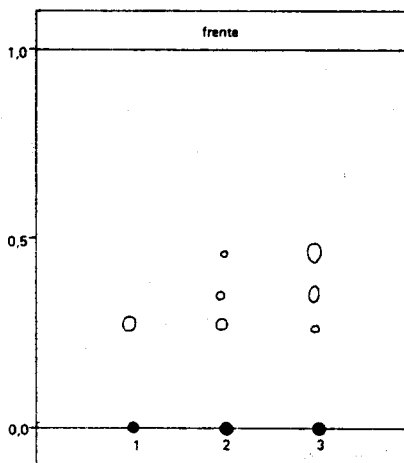


Figura 3. Cromatograma correspondiente a la fórmula I. 1: sulfato de neomicina; 2: muestra envejecida durante 3 días; 3: muestra envejecida durante 20 días.

Las muestras mantenidas durante un año en refrigerador no acusaron degradación cuantificable.

Los resultados obtenidos con diferentes concentraciones de fosfato disódico a fuerza iónica constante demuestran que, independientemente de la fuerza iónica, la concentración del ion monohidrógenofosfato tiene un efecto degradante especial sobre la neomicina. Entre 0,25% hasta 1,25% de fosfato disódico se observa un efecto muy grande sobre la estabilidad del antibiótico, mientras que a partir de esa concentración hasta 2,5% se comprueba que la velocidad de degradación es menor (Fig. 4).

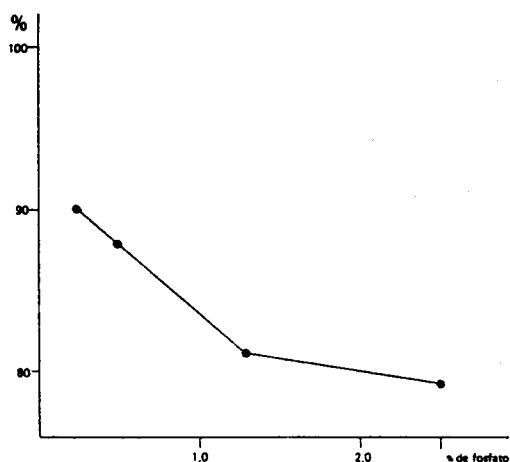


Figura 4. Estabilidad del sulfato de neomicina durante 5 días a 65 °C, en función de la concentración del fosfato disódico a fuerza iónica constante ($\mu = 0,6$ / Cloruro de sodio en cantidad suficiente).

AGRADECIMIENTOS. Agradecemos a la Prof. Lic. María Inés Sarchi, del Departamento de Matemáticas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, su colaboración en el estudio estadístico de los datos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Simone, R.M. y R.P. Popino (1955) *J. Amer. Pharm. Assoc.* 44: 275-80
2. Dale, J.K. y S.J. Rundman (1957) *J. Amer. Pharm. Assoc. (pract. ed.)* 18: 121-5
3. Hein, H. (1962) *Zentr. Bakteriol. Parasitenk. Abt. I*, 185: 416-25
4. Harris, W.A. (1971) *Australas. J. Pharm.* 52: s 69-71
5. Singh, C. (1964) *Indian J. Chem.* 2: 67-71
6. Hodges, N.A. y P.G. Walton (1981) *J. Pharm. Sci.* 70: 960-1
7. Swart, E.A., D. Hutchinson y S.A. Waksman (1949) *Arch. Biochem.* 24: 92-103
8. Leach, B.E., W.H. De Vries, H.A. Nelson, W.G. Jackson y J.S. Evans (1950) *J. Amer. Chem. Soc.* 73: 2797-800
9. Tanaka, I., H. Yoshizawa, S. Otani, J. Nakayashiki y E. Hara (1962) *Yakuzigaku* 22: 147-50
10. Gecgil, S. (1968) *Istambul Univ. Eczacilik Fak. Mecmuasi* 2: 56-7
11. Heyd, A. (1971) *J. Pharm. Sci.* 60: 1343-5
12. Coates, L.V., M.M. Pashley y K. Tattersall (1961) *J. Pharm. Pharmacol.* 13: 620-4
13. Hammouda, Y. y S. Salakawy (1971) *Pharmazie* 26: 636-40
14. Reinhart, K.L. (1964) "Neomycins and related antibiotics", Wiley, New York
15. Heyes, W. (1979) "Analytical Profile Drug Substances" vol. 8, Academic Press, New York, págs. 399-488
16. Morgan, J.W., A.B. Honig, A.T. Warren y S. Levine (1961) *J. Pharm. Sci.* 50: 668-71
17. McGinity, J. y J. Hill (1975) *J. Pharm. Sci.* 64: 1566-8
18. Hodges, N.A. y J. Singh (1978) *J. Pharm. Pharmacol.* 30: 737-9
19. *The United States Pharmacopœia XX - National Formulary XV* (1980) U.S. Pharmacopœial Convention, Inc., Rockville Md., pág. 28
20. Mundell, M., H. Fischback y T. Eble (1946) *J. Amer. Pharm. Assoc.* 35: 373-5
21. Moore, S. y W.H. Stein (1948) *J. Biol. Chem.* 176: 367-88
22. Foppiano, R. y B.B. Brown (1965) *J. Pharm. Sci.* 54: 206-8

23. Tomoda, M. (1963) *Chem. Pharm. Bull.* 11: 809-12
24. Das Gupta, V., K.R. Stewart y J. Gunter (1983) *J. Pharm. Sci.* 72: 1470-1
25. Van Giessen, B. y K. Tsuji (1971) *J. Pharm. Sci.* 60: 1068-70
26. Bacsa, B., J. Javor y L. Kiss (1984) *J. Liq. Chrom.* 7: 2803-5
27. Tsuji, K., J.F. Goetz, W. Van Metter y K. Gusciora (1979) *J. Chromatog.* 175: 141-52
28. Binns, R.B. y K. Tsuji (1984) *J. Pharm. Sci.* 73: 69-72
29. Shaikh, B., E.H. Allen y J.C. Gridley (1985) *J.A.O.A.C.* 68: 29-31
30. Nonzioli, A.C. (1975) *SAFYBI* 15: 911-23