

Determinación del Disofenol por Espectrofotometría UV-Vis

Rolando GONZÁLEZ *, Yamile HEREDÍA **,
Francisco CONCEPCIÓN * y Ángel RODRÍGUEZ *

*Centro de Química Farmacéutica, División de Calidad,
Laboratorio de Análisis Instrumental y Control de Calidad,
Calle 200 y 21, Atabey, Playa, CP 14042, Ciudad de la Habana, Cuba.

**Universidad de Oriente, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas,
Departamento de Farmacia, Santiago de Cuba, Cuba

RESUMEN. Se desarrolló una técnica para la determinación cuantitativa por espectrofotometría UV-Vis A 407 nm de la materia prima disofenol, producto de reconocida actividad antihelmíntica. Mediante una validación prospectiva del método se demostró que fue lineal ($r = 0,98$), preciso (repetibilidad CV = 0,74% y reproducibilidad CV = 0,79%), exacto (midió las cantidades añadidas) y selectivo (se cuantificó el compuesto de interés en presencia de p-nitrofenol, impureza de la síntesis). El método espectrofotométrico estudiado fue confiable para la determinación del disofenol degradado hasta menos de un 20% y fue capaz de producir resultados satisfactorios dentro de las condiciones de trabajo establecidas.

SUMMARY. "Determination of Disophenol by UV-Vis Spectrophotometry". A technique for quantitative determination by UV-Vis spectrophotometry of disophenol at 407 nm, an antihelmintic bulk drug, was developed. A prospective validation of the method showed that the method was linear ($r = 0,9791$), precise (repeatability CV = 0.74% and reproducibility CV = 0.79%), accurate (it measured the added quantities) and selective (it quantified disophenol in presence of p-nitrophenol, impurity of the synthesis). The spectrophotometric method is reliable to determine degraded disophenol upon a 20% and it is able to give satisfactory results into the established work conditions.

INTRODUCCION

El disofenol (2,6-diiodo-4-nitrofenol) ha sido empleado históricamente en el tratamiento de las parasitosis producidas por *Fasciola hepática*¹⁻³ en ganado bovino, ovino y caprino por *Haemonchus contortus*^{1,4-7} y *Oesophagostomum columbianum*^{1,7} en ovejas y carneros, por *Ancylostomas caninum*^{1,8} en gatos y perros y en la ascariasis⁹⁻¹⁰ en aves. Reportes actualizados confirman que el disofenol posee una efectividad superior al 99% contra el *Haemonchus contortus* en carneros¹¹⁻¹³ y del 100% contra el *Ancylostoma caninum*¹⁴. En el tratamiento contra este último helminto fue observado un significativo incremento en la hemoglobina y niveles de eritrocitos al ser aplicados a 7 mg/kg s.c. en perros¹⁵. Además, este com-

PALABRAS CLAVE: Disofenol, 2,4-diiodo-4-nitrofenol, Validación, Espectrofotometría UV-Vis, Cuantificación.

KEY WORDS: Disophenol, 2,4-diiodo-4-nitrophenol, validation, UV-Vis spectrophotometry, quantitation.

puesto aparece indezado dentro del grupo de los compuestos nitrofenólicos de uso universal y en existencia en el mercado para el tratamiento de la *Fasciola hepática* y otros helmintos ¹⁶.

Los métodos analíticos para la cuantificación del disofenol reportados en la literatura ¹⁷⁻¹⁹ no son adecuados para el control de calidad de la materia prima, debido a que todos necesitan reactivos complejos y varias etapas que a su vez no permiten analizar una cantidad relativamente grande de muestras en un tiempo relativamente corto. Por esta razón, en el presente trabajo se estudia un nuevo método para su posible utilización en el control de calidad y en los estudios de estabilidad.

Para probar la confiabilidad y capacidad del método propuesto se decidió llevar a cabo una validación prospectiva mediante el estudio de los parámetros de linealidad, precisión, exactitud y especificidad, lo cual responde a las exigencias legales establecidas de acuerdo a la clasificación del método analítico que se valida ²⁰.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la validación se utilizaron dos lotes de disofenol: en el estudio de linealidad, exactitud y especificidad uno caracterizado como sustancia química de referencia de trabajo (SQRT), con un $99,60 \pm 0,99\%$ de pureza m/m obtenida por potenciometría, y en el estudio de precisión otro obtenido en un escalado a 2 L de la materia prima ($99,50 \pm 0,5\%$ de pureza m/m, obtenida por potenciometría). Las mediciones de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro UV-Vis BioChrom 4060 y los datos experimentales fueron analizados mediante el programa computarizado del equipo BioChrom 4060 ²¹.

El correcto funcionamiento del equipo se comprobó mediante un filtro de óxido de holmio (para el control de la longitud de onda) ²² y con una disolución de dicromato de potasio UV (para el control de la absorbancia) ²³.

Aunque el disofenol es prácticamente insoluble en agua ²⁴ se logró obtener su espectro ultravioleta-visible (UV-Vis) de una disolución acuosa (Figura 1). A partir de estos resultados se diseñó un método espectrofotométrico para su determinación cuantitativa a 407 nm.

Reactivos utilizados

Solución estándar de dicromato de potasio UV preparada según la Farmacopea Británica ²⁴ con dicromato de potasio para análisis (Merck) y ácido sulfúrico para análisis (Merck), ácido clorhídrico fixanal 0,1 mol/L (Merck), hidróxido de sodio fixanal 0,1 mol/L (Merck), hiposulfito de sodio reactivo de laboratorio (BDH) y peróxido de hidrógeno al 30 % (Riedel-deHaën).

Evaluación de los parámetros de validación

Linealidad

De una disolución de disofenol SQRT de 20 microgramos/mL ($5,11 \cdot 10^{-5}$ mol/L) se prepararon cinco disoluciones en un rango de 80-120 % sobre la base de una concentración teórica de 10 μ g/mL. Con estas disoluciones se construyó la curva de calibración durante tres días por tres analistas diferentes y se determinaron los parámetros fundamentales de la ecuación de la recta obtenida.

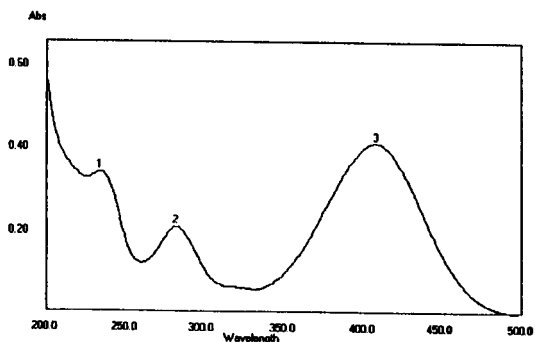


Figura 1. Espectro UV-Vis de la disolución acuosa de disofenol ($8,5 \cdot 10^{-5}$ mol/L), 1 - 233,8 (0,344); 2 - 281,5 (0,209); 3 - 407,1 (0,413).

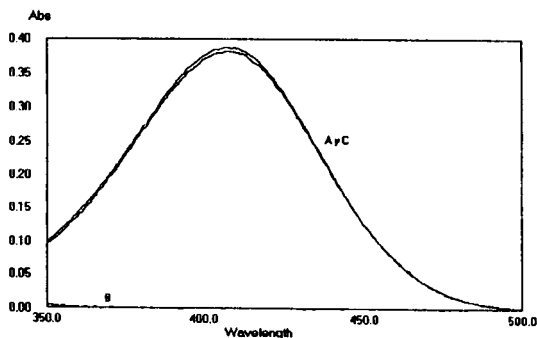


Figura 2. Espectros UV-Vis de las disoluciones de disofenol 99,2% m/m (A), de p-nitrofenol 0,8% m/m (B) y de la mezcla de ambos (C).

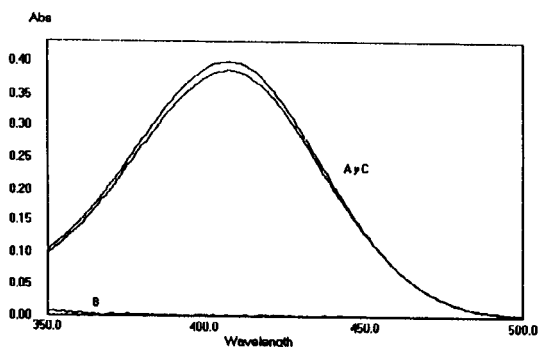


Figura 3. Espectros UV-Vis de las disoluciones de disofenol 98,4% m/m (A), de p-nitrofenol 1,6% m/m (B) y de la mezcla de ambos (C).

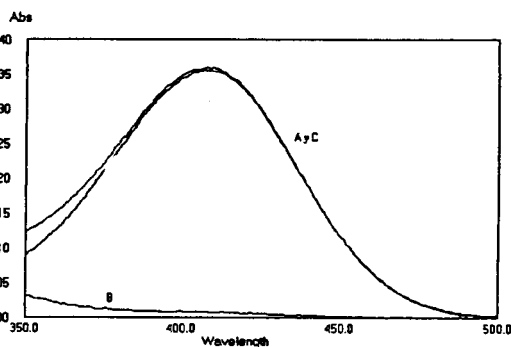


Figura 4. Espectro UV-Vis de las disoluciones de disofenol 90,4% m/m (A), de p-nitrofenol 9,6% m/m (B) y de la mezcla de ambos (C).

Precisión

Se utilizaron disoluciones de disofenol de un contenido teórico de 9,00 $\mu\text{g/mL}$ y 11,00 $\mu\text{g/mL}$ preparadas a partir de una disolución de 20 $\mu\text{g/mL}$ nueve veces en un día para el estudio de repetibilidad y durante tres días por tres análisis diferentes para el estudio de reproducibilidad.

Exactitud

Se utilizaron los datos experimentales obtenidos en el estudio de repetibilidad y la media de los resultados se comparó con un valor considerado real (100%) mediante una prueba t (t de Student).

Especificidad

Se obtuvieron los espectros UV-Vis de las disoluciones de disofenol SQRT y de varias mezclas (Figuras 3-7) que contenían disofenol SQRT y p-nitrofenol (sustancia relacionada de la síntesis que absorbe en la zona del espectro electromagnético de trabajo). Además, se analizaron muestras de disofenol sometidas a un proceso de degradación acelerada mediante una hidrólisis básica, ácida, en medio oxidante y en medio reductor fuertes durante más de 1 mes. Para la obtención de estas disoluciones se pesó 1,0 g de disofenol lote de producción y se disolvió en

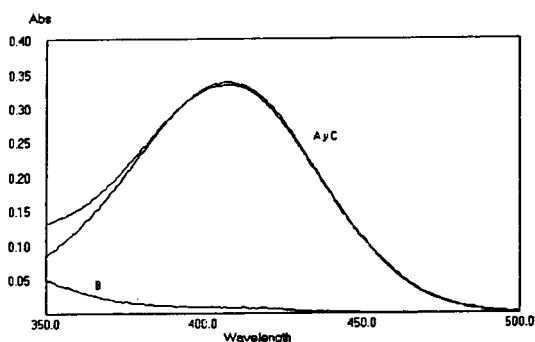


Figura 5. Espectros UV-Vis de las disoluciones de disofenol 84,4% m/m (A), de p-nitrofenol 15,2 % m/m (B) y de la mezcla de ambos (C).

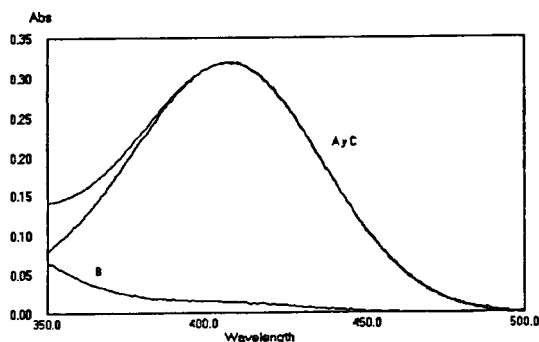


Figura 6. Espectros UV-Vis de las disoluciones de disofenol 80% m/m (A), de p-nitrofenol 20% m/m (B) y de la mezcla de ambos (C).

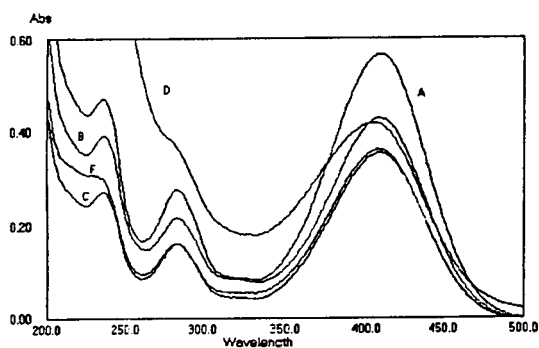


Figura 7. Espectros UV-Vis de las disoluciones de disofenol SQRT (12 µg/mL) (A) y del disofenol degradado en medio ácido (B), en medio alcalino (C) en medio oxidante (D) y en medio reductor (E) durante un mes.

medio ácido con ácido clorhídrico 0,1 mol/L (S1), en medio básico con hidróxido de sodio 0,1 mol/L (S2), en medio oxidante con peróxido de hidrógeno 9 mol/L (S3) y en medio reductor con hiposulfito de sodio 3×10^{-3} mol/L (S4). Para su análisis por el método espectrofotométrico que se valida de S1 se tomaron 150 µL, de S2 100 µL, de S3 1500 µL y de S4 2000 µL y cada uno se diluyó hasta un volumen de 100 mL.

El procedimiento estadístico de los resultados experimentales se realizó con ayuda del programa estadístico Statgraphics ²⁵.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestran los parámetros estadísticos correspondientes a la curva de calibración de disofenol a 407 nm.

Rango lineal (µg/mL)	8,00-12,00
Curva de calibración	$y = 0,0027 + 0,0388 x$
Pendiente, b	0,0388
Desviación típica de la pendiente, Sb	0,0007
Coefficiente de variación de la pendiente	1,7957%
Intervalo de confianza de la pendiente $b \pm t Sb$	$(0,0373) \pm (0,0403)$
Intercepto, a	0,0027
Desviación típica del intercepto, Sa	0,0070
Intervalo de confianza del intercepto, $a \pm Sa$	$(-0,0124) \pm (0,0178)$
Coefficiente de correlación, r	0,9791
t_r	55,6469

Tabla 1. Resultados del ajuste de la curva de calibración concentración-absorbancia mediante el método de los mínimos cuadrados.

donde: $t = 2,160$ ($\alpha = 0,05$, $n = 15$, $f = n-2 = 13$) - valor de t tabulado para el cálculo de intervalos de confianza del intercepto y de la pendiente, $t = 1,98$ ($\alpha = 0,05$, $f = 120$) - valor de t tabulado para comparar con el de la correlación lineal significativa, t_r = valor experimental de la correlación lineal significativa con $n-2$ grados de libertad para evaluar linealidad.

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en el estudio de precisión,

	Repetibilidad		Reproducibilidad	
	conc. 1 $c_1 = 9,00$ $\mu\text{g/mL}$	conc. 2 $c_2 = 11,00$ $\mu\text{g/mL}$	conc. 1 $c_1 = 9,00$ $\mu\text{g/mL}$	conc. 2 $c_2 = 11,00$ $\mu\text{g/mL}$
Media	8,997 \pm 0,068	10,959 \pm 0,041	9,057 \pm 0,035	10,961 \pm 0,027
S	0,089	0,053	0,090	0,070
g_{exp}	0,7380		0,623	
S_{rep}	0,074		0,079	
CV(%)	0,74		0,79	

Tabla 2. Resultados de los estudios de precision en la determinación de la concentración de disofenol en disoluciones acuosas.

donde: $g_{tab} = 0,8159$ ($\alpha = 0,05$, $f = n-1 = 8$, $m = 2$), $g_{tab} = 0,6972$ ($\alpha = 0,05$, $f = n-1 = 26$, $m = 2$), $t_{tab} = 2,306$ ($\alpha = 0,05$, $f = n-1 = 8$), $t_{tab} = 2,056$ ($\alpha = 0,05$ y $f = 26$), S_{rep} = desviación típica del ensayo de repetibilidad o reproducibilidad.

En la Tabla 3 se muestran los resultados del estudio de exactitud.

	Cantidad añadida $c_1 = 9,00 \mu\text{g/mL}$	Cantidad recuperada $C_2 = 11,00 \mu\text{g/mL}$
Cantidad recuperada	8,997 \pm 0,068	10,959 \pm 0,041
g_{exp}	0,738	
Media Recobrado, %	99,77 \pm 0,38	
CV, %	0,77	
t_{exp}	1,262	

Tabla 3. Resultados del estudio de exactitud de la determinación de la concentración de disofenol en las disoluciones acuosas.

donde: $g_{tab} = 0,8159$ ($\alpha = 0,05$, $f = n-1 = 8$, $m = 2$), S - desviación típica, CV - coeficiente de variación, $t_{tab} = 2,11$, ($\alpha = 0,05$, $f = n-1 = 17$)

Los resultados obtenidos en el estudio de especificidad se muestran en la Tabla 4 y en las Figuras 2, 3, 4, 5, 6 y 7.

DSF SQRT	A ₄₀₇	PNP	A ₄₀₇	Mezclas	A ₄₀₇
99,2 %	0,382	0,8 %	0,002	1	0,387
98,4 %	0,385	1,6 %	0,002	2	0,400
90,4 %	0,355	9,6 %	0,009	3	0,359
84,8 %	0,338	15,2 %	0,010	4	0,333
80,0 %	0,319	20,0 %	0,016	5	0,318

Tabla 4. Valores de absorbancia a 407 nm (A₄₀₇) de las disoluciones de disofenol SQRT (DSF SQTR), de p-nitrofenol (PNP) y de las mezclas de ambos a diferentes porcentajes.

DISCUSION

Los resultados del estudio de linealidad (Tabla 1) demostraron la existencia de una correlación lineal positiva, el coeficiente de correlación fue cercano a la unidad mostrando una buena linealidad ²⁶ y evidenciando el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer.

El intervalo de confianza del intercepto incluye el cero para un 5% de significación (lo que permite descartar la presencia de errores sistemáticos y confirmar los requerimientos teóricos de la ley ²⁶).

El coeficiente de variación de la pendiente es menor que el límite establecido del 2% ²⁷ (lográndose una buena sensibilidad) y el valor del coeficiente de correlación lineal (t_r) calculado es mucho mayor que el valor de t tabulado, por lo que se puede afirmar que existe correlación entre las concentraciones de disofenol preparadas y los valores de absorbancia medidos ²⁸.

En el estudio de precisión la prueba de Cochran (prueba g) demostró que en la repetibilidad y en la reproducibilidad el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados, ya que en ambos casos la g experimental fue menor que la g tabulada (Tabla 2). Asimismo, como era de esperar, los coeficientes de variación fueron mayores cuando se analizaron las concentraciones más pequeñas y el coeficiente de variación de la reproducibilidad (menor que el 2% recomendado ²⁹) fue ligeramente mayor que el de la repetibilidad (menor que el 1% reportado ²⁵).

En el estudio de exactitud se obtuvieron resultados (Tabla 3) que permiten asegurar que la espectrofotometría UV-Vis es un método exacto para la determinación del contenido de disofenol en la materia prima para un nivel de significación del 5%, ya que el valor de t experimental fue menor que el valor de t tabulado, por lo que se comprobó que no existieron diferencias significativas entre la cantidad recuperada y la cantidad añadida.

Teniendo en cuenta que los productos farmacéuticos pueden contener hasta un 2% de impurezas ³⁰, que para estudios de estabilidad se debe evaluar hasta un 20% de degradación del principio activo ³¹ y considerando que el p-nitrofenol es un posible producto de degradación, los resultados obtenidos (Tabla 4) permiten afirmar que la técnica estudiada es apta para la determinación del disofenol en presencia de hasta un 20% de producto de degradación. En la mezcla 2 (Figura 3) se observa variación en el valor de absorbancia en la primera cifra, lo que puede

atribuirse a un error de precisión del analista. Las variaciones de los resultados en la tercera cifra se encuentran en el error de medición del equipo.

Los valores de absorbancia del p-nitrofenol a esta longitud de onda son muy pequeños, no interfiriendo en la determinación. A la longitud de onda de trabajo (407 nm) la presencia de p-nitrofenol no interfiere en la determinación del disofenol.

La cantidad de disofenol presente en las disoluciones degradadas fueron mayores en los medios ácido y básico (60,78% y 81,43% respectivamente), mientras que en los medios oxidante y reductor (6,5% y 4,5% respectivamente) la degradación fue mayor y en ninguno de los casos los productos de degradación influyeron en la determinación del compuesto en estudio.

CONCLUSIONES

1. El método validado es lineal, preciso y exacto.
2. La espectrofotometría UV-Vis es un método selectivo para la determinación cuantitativa del disofenol materia prima en presencia de hasta un 20% de p-nitrofenol y en presencia de más de un 90% de productos de degradación, demostrado en el estudio de selectividad.
3. El método validado permite obtener resultados confiables para su utilización como técnica alternativa en el control de calidad del disofenol materia prima y en los estudios de estabilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Campbell, A. & P.E. Montague (1981) *Mol. Biochem. Parasitol.* **4**: 139-47
2. Echevarría, F.A. & A.C. Pinheiro (1979) *Pesqui. Agropecu. Bras.* **14**: 155-7
3. Fowler, M.S.L. (1971) *Brit. Vet. J.* **127**: 304-12
4. Reinecke, R.K., C. Bruckner & I.L. De Villiers (1981) *J. Vet. Res.* **48**: 235-8
5. Hall, C.A., J.D. Kelley & H.V. Whitlok (1981) *Res. Vet. Sci.* **31**: 104-6
6. González, M.C. & P.C. Gonçalves (1973) *Pesqui. Agropecu. Bras. Ser. Vet.* **8**: 21-4
7. Rocha, U.F. & M. Santos de Campos (1967) *Bol. Ind. Anim.* **24**: 89-103
8. Wong, G.T. (1970) *J. Am. Vet.-Med. Ass.* **157**: 1077-81
9. Vyhvalex, J. (1970) *Vet. Med.* **15**: 77-81
10. Skhirtlanda, S.N. (1975) *Sb. Tr. Gruz. Zootekk-Vet. Uchebo-Issled Inst.* **39**: 354-7
11. Wyk, J.A., P.C. van Schalkwyk, H.M. Gerger, E.L. Nisser, L. Van Schalkwyk & J.A. van Wyk (1989) *Onderstepoort J. of Vet. Res.* **56**: 257-62
12. Wyk, J.A., P.C. van Schalkwyk, G.F. Bath, H.M. Gerger & R.M. Alves (1991) *Onderstepoort J. of Vet. Res.* **62**: 171-5
13. Louw, J.P. & R.K. Reinecke (1992) *J.S. Afr. Vet. Assoc.* **63**: 54-8
14. Arle, B.K., D.U. Lokhande, V.E. Narwade & J.H. Kazi (1992) *Ind. Vet. J.* **69**: 831-3
15. Srijayanth, R.V., N. Appaji-Tao & N. Raghavan (1987) *Ind. J. of Vet. Med.* **7**: 150-1
16. McKellar, Q.A. & L.D.B. Kinabo (1991) *British Vet. J.* **147**: 306-21
17. Gasparic, J. (1964) *Z. Anal. Chem.* **199**: 276-90
18. Soobodova, D. & Y. Valaskova (1972) *Cesk Farm.* **21**: 156-9
19. Selig, W. (1978) *Microchim. Acta* **2**: 359-71

20. *USP XXII/NF XVII* (1990) "Validation of Compendial Methods" pág. 1710 e "Impurities in Official Articles" pág. 1682
21. Bunnage, L. "*Bichrom 4060: Variable Wavelength Scanning Spectrophotometer, version 1.*" (1992) (Pharmacia LKB Biochrom Ltd.)
22. "*Beckman Instructions: 15-082 245-A*" (1973). (Fullerton: Beckman Instruments Inc.) pág. 3
23. "*Appendix II B: Ultra-violet and Visible spectrophotometry, A74 y Appendix IA: General Reagents, Potassium Dichromate solution UV*" (1988) (*British Pharmacopoeia*) pág. A 44
24. "*The Index Merck*" (1989) (Merck y Co. eds.) pág. 3375
25. "*Statgraphics Plus for Windows 1.0*" (1994) Statistical Graphics Corporation (STGC, Inc.)
26. Torrez, A.I. & M.A. Camacho (1992) *STP Pharma Pratiques* 2: 93-9
27. Calpena, A.C., E. Escribano y C. Fernandez (1990) *Farmacia Clínica* 7: 749-58
28. Quattroshi, O.A. (1992) "*Introducción al HPLC: Aplicacion y Práctica*" (Buenos Aires: Artes Gráficas Farro S.A.) pág. 301
29. DeSain, C. (1992) *Biopharm.* 6: 30-4
30. Rampazoo, P. (1990) *Il Farmaco* 45: 807-15