

DETERMINACION DE CLORHIDRATO DE LIDOCAINA Y EPINEFRINA EN SOLUCIONES ANESTÉSICAS INYECTABLES DE USO DENTAL POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON DETECCIÓN U.V.

DETERMINATION OF LIDOCAINE HYDROCHLORIDE AND EPINEPHRINE IN
ANESTHETIC INJECTABLE SOLUTIONS OF DENTAL USE BY HIGH PERFORMANCE
LIQUID CROMATOGRAPHY WITH U.V. DETECTION

Alejandro RAMÍREZ V.^{1*}, María M. MEDINA H.¹, Omar O. FRANCO G¹.

RESUMEN

En este trabajo se presenta el desarrollo de una metodología analítica para la cuantificación de Epinefrina y clorhidrato de Lidocaína por cromatografía líquida en fase reversa, en soluciones anestésicas inyectables de uso dental. A diferencia de la metodología propuesta en la monografía de la farmacopea norteamericana USP 26, la cual requiere del uso de dos detectores acoplados en serie, únicamente detección UV es empleada. El método es selectivo, exacto y preciso, como lo indican los resultados de los parámetros estudiados durante la validación.

Palabras clave: *Clorhidrato de Lidocaína, Epinefrina, soluciones anestésicas inyectables, HPLC.*

ABSTRACT

In this work the development of an analytic methodology for the quantification of Epinephrine and Lidocaine hydrochloride by reversed phase high performance liquid chromatography, in injectable solutions of dental use is presented. Contrary to the methodology proposed in the monograph of the North American pharmacopeia USP 26, which requires the use of two detectors coupled in series, only UV detection is used. The method is selective, exact and precise, as it is indicated by the results of the studied parameters during the validation.

Key words: *Lidocaine hydrochloride, Epinephrine, anesthetic injectable solutions, HPLC.*

¹ New Stetic S.A. A.A 1759 Medellín-Colombia. PBX 5500000. Teléfono: 5513122. Fax: 5513134.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: ofranco@newstetic.com.

INTRODUCCIÓN

La Lidocaína se sintetiza por primera vez en 1943, es introducida en 1948 como el primer anestésico local del tipo aminoamida (véase figura 1a), convirtiéndose en uno de los anestésicos locales de uso dental más empleado. Comercialmente se encuentra como solución inyectable al 2% (peso/volumen) en cápsulas de vidrio o polipropileno de 1.8 mL. Frecuentemente a esta solución inyectable se le adiciona Epinefrina (véase figura 1b), un vasoconstrictor que prolonga el tiempo de acción del medicamento y facilita los procedi-

mientos quirúrgicos. La Epinefrina puede tener concentraciones de 0.0200 mg/mL (1:50000), 0.0125 mg/mL (1:80000) y 0.0100 mg/mL (1:100000) (1-3).

La Lidocaína es una molécula bastante estable que no se degrada fácilmente bajo las condiciones normales de almacenamiento. La Epinefrina puede degradarse fácilmente en soluciones acuosas mediante mecanismos de oxidación o sustitución nucleofílica del OH que se encuentra sobre el carbono quiral. Este último mecanismo es originado por especies sulfito que provienen del metabisulfito o bisulfito de sodio, usados como antioxidantes (4 - 6).

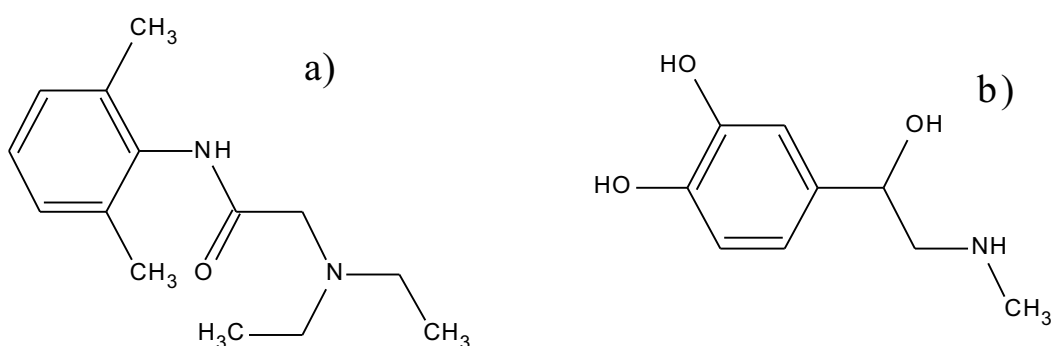


Figura 1. Estructura química de a) Lidocaína base y b) Epinefrina base.

Es posible encontrar en la literatura algunas metodologías que utilizan cromatografía líquida de alta eficiencia para la determinación de Lidocaína y Epinefrina, entre ellas el método analítico presentado en la monografía de la farmacopea norteamericana USP-26 (4,7,8). Sin embargo, la implementación de estas metodologías requiere el uso de dos detectores, ultravioleta para la detección de Lidocaína y electroquímico para la detección de Epinefrina, y dos fases móviles diferentes, por lo que la cuantificación de los principios activos es hecha en dos análisis independientes. Además, durante la determinación de Epinefrina, el hierro (II) (que puede desprenderse de las tuberías de acero inoxidable del sistema cromatográfico) eluye inmediatamente después de la Epinefrina como un pico electroquímicamente activo, haciendo necesario la adición de un agente complejante en la fase móvil, generalmente edetato de sodio, para su eliminación (4,7).

El propósito de este trabajo es desarrollar un método por RP-HPLC que permita cuantificar de una manera rápida, económica y confiable Lidocaína y Epinefrina en soluciones anestésicas inyectables de uso dental, usando detección U.V y calibración con estándares externos.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Equipos

El sistema cromatográfico es controlado a través de una PC micron con el software Class VP 7.2 y lo conforman un inyector manual con capacidad para 20 mL, una bomba cuaternaria LC-10AT (Shimadzu) con capacidad de gradiente de elución, un detector UV-VIS SPD-M10A (Shimadzu) con arreglo de diodos y un horno CTO-10A (Shimadzu) ajustado a 30 °C. La separación se realiza usando una columna shimadzu C-18 sobre sílica gel (5 μm de diámetro de partícula, 150*4.6 mm d.i.).

Reactivos

Metanol grado HPLC (Mallinckrodt), ácido acético, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico y metabisulfito de sodio grado analítico (Merck), Lidocaína (Rhenochem AG 99.6 % de pureza), Epinefrina (Boehringer Ingelheim 99.46% de pureza), benzoato de sodio (Noveun Kaloma Inc) y cloruro de sodio (Akzo Nobel) todos grado USP, muestra de Lidocaína 2% E-80 ®.

Condiciones del sistema cromatográfico

La fase móvil consta de una solución acuosa de ácido acético, preparada al mezclar 50 mL de ácido acético glacial en 930 mL de agua y ajustando el pH a 3.20 con una solución de hidróxido de sodio 0.1N (eluyente A), y metanol (eluyente B). Para obtener la separación cromatográfica se usa el gradiente que se muestra en la tabla 1. La Lidocaína se detecta y cuantifica a 260 nm, la Epinefrina se detecta y cuantifica a 276 nm.

Tabla 1. Composición del gradiente.

Tiempo (min)	Eluyente B ^a (% de flujo)	Velocidad de flujo (mL/min)	Actividad
0.00	0	0.7	Inyección de la muestra
3.01	45	0.7	
4.00	45	1.4	
9.00	45	1.4	Fin del análisis
10.01	0	1.4	Regreso a la composición del gradiente inicial. Equilibrar la columna
15.00	0	0.7	Comienza el siguiente análisis

a) todos los segmentos del gradiente son lineales

Preparación de las soluciones stock y los estándares

Antes de ser inyectada, la muestra es diluida en un factor de 5 (por ejemplo: 1.0 mL de muestra es diluido hasta completar un volumen de 5.0 mL usando el eluyente A). Para construir las curvas de calibración, en los niveles de concentración de los estándares se utiliza esta misma dilución.

Matriz de la muestra

1.9 (± 0.01) gramos de cloruro de sodio fueron disueltos en 100 mL de agua y llevados a un balón de 1 L, se adiciona 2.2 mL de ácido clorhídrico y se completa a volumen.

Placebo

Se prepara un placebo a partir de metabisulfito de sodio y benzoato de sodio. En los ensayos de especificidad, linealidad, precisión (repetitibilidad

y reproducibilidad) y exactitud, una alícuota de este placebo es adicionada a las diferentes soluciones de los principios activos, de manera que la concentración de los excipientes en cada análisis es igual a su concentración en el medicamento.

Soluciones stock

Lidocaína- Se pesan exactamente 1250 mg de Lidocaína (estándar de referencia USP), se llevan a un balón volumétrico de 50 mL, se disuelven y diluyen a volumen usando la matriz de la muestra. (CL = concentración de la solución stock de Lidocaína).

Epinefrina- Se llevan 50 mg de Epinefrina (estándar de referencia USP), exactamente pesados, a un balón volumétrico de 100 mL, el sólido se disuelve y se diluye a volumen usando la matriz de la muestra. De esta solución se toman 5 mL, se llevan a un balón volumétrico de 100 mL y se diluye usando nuevamente la matriz de la muestra. (CE = concentración de la solución stock de Epinefrina).

Soluciones estándar

Se preparan cinco soluciones estándar llevando alícuotas de 1, 2, 3, 4, 5 mL de la solución stock de Epinefrina y 3, 4, 5, 6, 7 mL de la solución stock de Lidocaína a balones de 25 mL, se adiciona el placebo y se afora con el eluente A. Los niveles de concentración para cada analito son estimados con un exceso de 50% sobre el límite superior y un defecto de 50% por debajo del límite inferior de la concentración de estos principios activos en el medicamento Lidocaína 2% E-80 ® (véase tabla 2).

Degradación artificial de los principios activos

Para el estudio de especificidad, los principios activos son degradados artificialmente en presencia del placebo como se indica a continuación:

Epinefrina

- Oxidación: se llevan alícuotas de 2, 4 y 10 mL de una solución stock de Epinefrina, preparada como se indica en placebo, a balones de 25 mL, se adiciona el placebo y 2 gotas de peróxido de hidrógeno al 30%, se afora usando el eluente A y se permite reacción durante 15 minutos.

Tabla 2.

Concentración para cada analito en las soluciones estándar.

Nivel	Concentración (mg/mL) ^a	
	C _L '	C _E '
1	3.00	0.0010
2	4.00	0.0020
3	5.00	0.0030
4	6.00	0.0040
5	7.00	0.0050

a) en donde CL' y CE' son las concentraciones de Lidocaína y Epinefrina en los estándares.

- Ataque por sulfito: se llevan alícuotas de 2, 4 y 10 mL de una solución stock de Epinefrina,

preparada como se indica en placebo, a balones de 25 mL, se adiciona el placebo y 2 mL de una solución de metabisulfito de sodio al 0.3% (peso/volumen), se completa el volumen usando el eluente A. Esta solución se calienta a 45 °C durante 15 minutos.

Lidocaína

- Oxidación: se pesan por separado 100 y 150 mg de Lidocaína y se disuelven en 15 mL del eluente A, se adiciona el placebo y 10 gotas de peróxido de hidrógeno, se procede a calentar suavemente a 45 °C por 30 minutos. Ambas soluciones son llevadas a balones de 25 mL y se aforaron usando el eluente A.
- Hidrólisis ácida: Se pesan 300 mg de clorhidrato de Lidocaína y se disuelven en 30 mL de HCl 1.0N, se adiciona el placebo y se somete a reflujo por 30 minutos. Esta solución se lleva cuantitativamente a un balón de 50 mL y se afora usando el eluente A.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido a que la Epinefrina se degrada fácilmente con el oxígeno atmosférico, en la evaluación de los parámetros estadísticos solo se trabajan tres réplicas.

Selectividad

La selectividad se determina de la siguiente forma: a) Inyectando el placebo, b) Inyectando los principios activos con el placebo, c) Inyectando el placebo con los productos de degradación de la Lidocaína o la Epinefrina, obtenidos artificialmente (10)

En las figuras 2 y 3 se presentan algunos de los resultados en este estudio. En estas figuras, los picos que corresponden a los principios activos y los excipientes son enumerados de uno a cuatro y los picos que corresponden a productos de degradación son nombrados usando el prefijo pd (véase tabla 3).

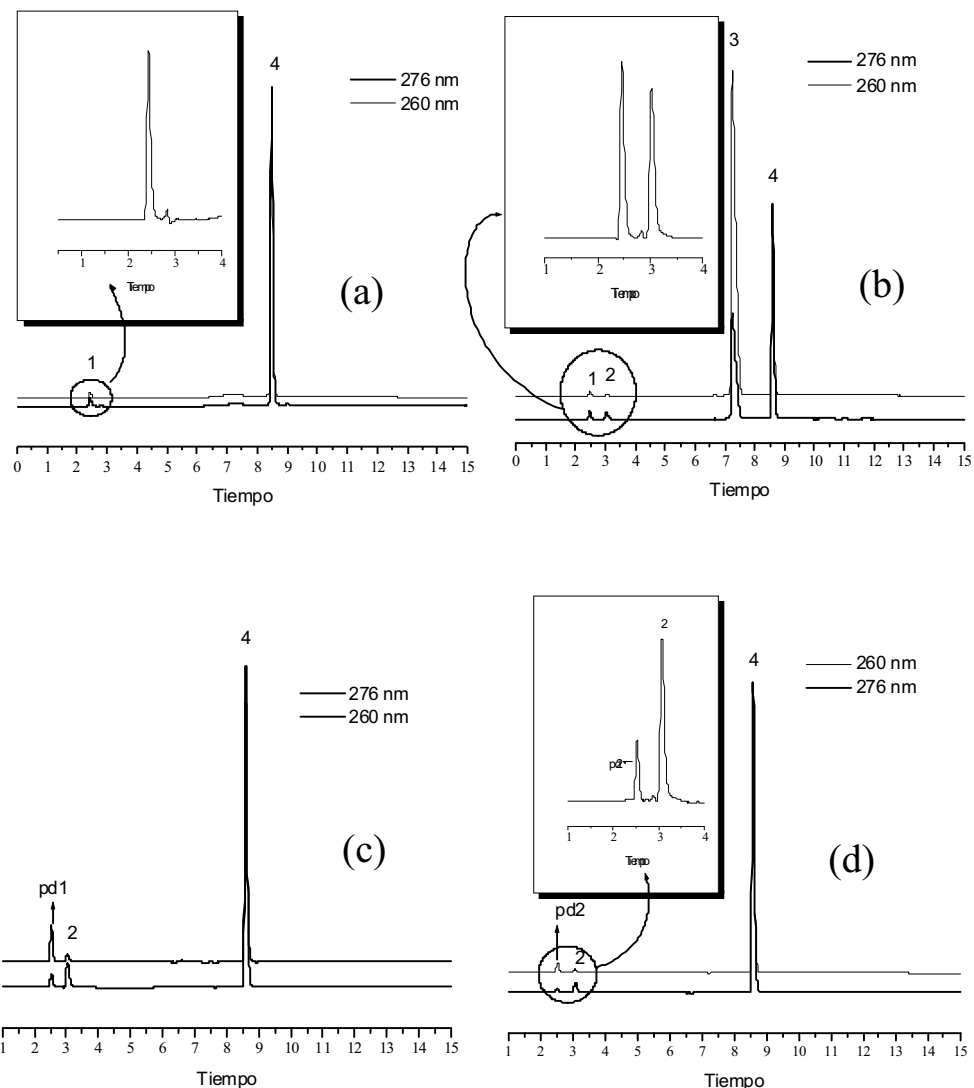


Figura 2. Resultados en el estudio de selectividad del método analítico: (a) placebo, (b) placebo con los principios activos, (c) y (d) placebo con los productos de degradación de la Epinefrina obtenidos artificialmente mediante oxidación y ataque por sulfito respectivamente.

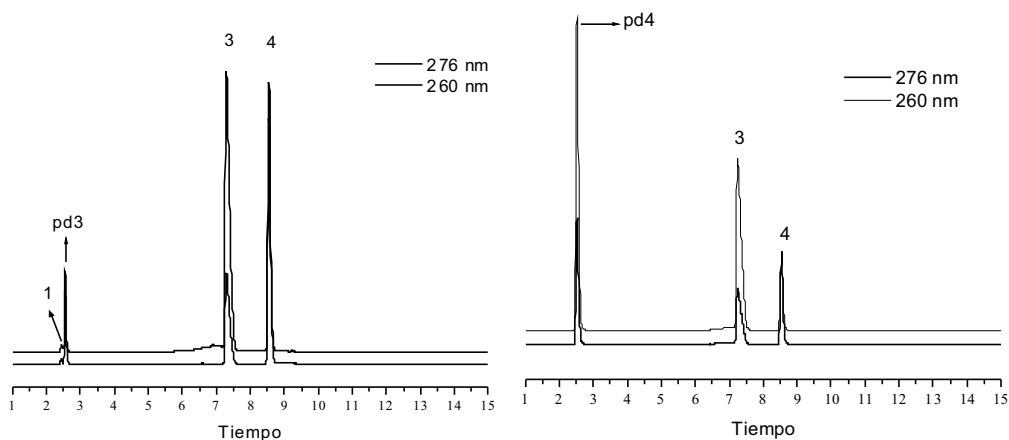


Figura 3. Resultados en el estudio de selectividad del método analítico: (a) y (b) placebo con los productos de degradación de la Lidocaína obtenidos artificialmente mediante hidrólisis ácida y oxidación respectivamente

Con la metodología propuesta, es posible separar los excipientes y los cuatro productos de degradación de los compuestos de interés (véase tabla 3).

Tabla 3. Tiempos de retención para los excipientes, los principios activos y sus productos de degradación.

Nombre del pico	Nombre del compuesto ^{a)}	tr ^{b)}
1	Metabisulfito de sodio	2.42
2	Epinefrina	3.03
3	Lidocaína	7.30
4	Benzoato de sodio	8.50
pd1	Oxidación de la Epinefrina	2.53
pd2	Ataque de sulfito en la Epinefrina	2.48
pd3	Hidrólisis ácida de la Lidocaína	2.55
pd4	Oxidación de la Lidocaína	2.53

a) Principios activos, excipientes y productos de degradación obtenidos artificialmente. b) tiempo de retención.

No se observa interferencia para ninguna de las tres concentraciones ensayadas, a los tiempos de retención de la Lidocaína y la Epinefrina.

Linealidad

La linealidad de la respuesta del detector para cada principio activo se determina en el rango que se menciona en la preparación de soluciones estándar (50-150% de la cantidad teórica reportada para el producto Lidocaína 2% E-80), cada nivel (5 en total) es inyectado por triplicado (n =

15). Para los gráficos de Área vs concentración (mg/mL) para la Epinefrina y la Lidocaína se tienen los siguientes resultados:

- Epinefrina:

Ecuación de la recta: Área = $2.24 \times 10^7 \times$ (concentración) + 4275, coeficiente de correlación (r) = 0.9998, coeficiente de determinación (r²) = 0.9996. Los límites de confianza para la pendiente y el intercepto son: $2.24 \times 10^7 \pm 2.23 \times 10^6$ y 4275 ± 7400 . (para P = 0.05 y n-2 grados de libertad).

- Lidocaína:

Ecuación de la recta: Área = $1.26 \times 10^6 \times$ (concentración) + 157899, coeficiente de correlación (r) = 0.9988, coeficiente de determinación (r²) = 0.9976. Los límites de confianza para la pendiente y el intercepto son: $1.26 \times 10^6 \pm 12483$ y $1.58 \times 10^5 \pm 1.77 \times 10^5$ (para P = 0.05 y n-2 grados de libertad).

Precisión

Para evaluar la reproducibilidad y la repetibilidad, se utilizan tres niveles de concentración. Estos niveles son representados como porcentajes y son obtenidos con base en la concentración teórica de los principios activos (Epinefrina y Lidocaína) en el producto Lidocaína 2% E-80®.

Repetibilidad

La tabla 4 presenta los resultados de repetibilidad para la Epinefrina y la Lidocaína. Aquí se muestra el porcentaje medio, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Tabla 4. Resultados de repetibilidad para la Epinefrina y la Lidocaína.

Porcentaje de los principios activos con respecto a Lidocaína		N° de análisis	Porcentaje medio \pm S		CV(%)	
Epinefrina	Lidocaína		Epinefrina	Lidocaína	Epinefrina	Lidocaína
80	75	3	73.3 \pm 2.3	74.6 \pm 1.0	3.2	1.3
120	100	3	122.7 \pm 2.4	99.9 \pm 0.1	1.9	0.1
160	125	3	162.7 \pm 2.4	126.1 \pm 0.4	1.4	0.3

En esta tabla se observa que el coeficiente de variación más alto para la Epinefrina se obtiene cuando el nivel de concentración es 80% (20% menos concentrado que en el producto Lidocaína 2% E-80®), este coeficiente de variación cae dentro del máximo aceptable de un método analítico cuando el límite de aceptación del resultado esta entre 95-105 y se tienen tres réplicas (%CV = 3.3). Los coeficientes de variación para la Lidocaína no son mayores de 1.3 %.

Algunas publicaciones presentan reglas que indican que los coeficientes de variación máximos permitidos para un analito son función de su porcentaje en la muestra. Para la Epinefrina,

que en la muestra tiene un porcentaje de 0.00125%, estos CV pueden ser hasta un 7.3% (9). Los resultados están por debajo de este valor.

Reproducibilidad

El análisis de los tres niveles de concentración es realizado por triplicado por dos analistas diferentes en días diferentes.

La tabla 5 presenta los resultados de reproducibilidad para la Epinefrina y la Lidocaína. Aquí también se muestra el porcentaje medio, la desviación estándar y el coeficiente de variación como porcentaje.

Tabla 5. Resultados de reproducibilidad para la Epinefrina y la Lidocaína.

Porcentaje de los principios activos con respecto a Lidocaína 2% E-80		Resultado (%)		Resultado (%)		Porcentaje medio \pm S		CV(%)	
		Epinefrina		Lidocaína		Epinefrina	Lidocaína	Epinefrina	Lidocaína
		1 ^{er} Analista	2 ^{do} Analista	1 ^{er} Analista	2 ^{do} Analista				
Epinefrina	Lidocaína								
80	75	72.0 76.0 72.0	83.8 80.0 76.2	75.7 74.0 74.0	74.0 73.8 73.5	76.7 \pm 4.6	74.2 \pm 0.35	6.1	0.5
120	100	120.0 124.1 124.1	120.0 123.9 123.9	99.8 99.8 100.0	99.5 99.7 100.0	122.7 \pm 2.1	99.8 \pm 0.17	1.7	0.2
160	125	164.1 160.0 164.1	160.0 160.0 156.2	126.5 126.0 125.8	124.2 124.7 125.0	160.7 \pm 3.0	125.4 \pm 0.62	1.9	0.5

En esta tabla se observa que el coeficiente de variación más alto para la Epinefrina es de 6.1%. Este coeficiente cumple con el máximo aceptable, el cual no debe ser mayor al doble del valor obtenido en el parámetro de repetitibilidad (6.4%). El coeficiente de variación más alto para la Lidocaína es de 0.5%. Estos datos indican que el método cumple con los criterios aceptables de un método analítico para un límite de aceptación entre 95-105% y tres réplicas (9).

Exactitud

Para determinar si la exactitud es aceptable se expresan los resultados empleados en la evaluación de la repetitibilidad como porcentajes de recuperación y se aplica una prueba t ($P = 0.05$, $n = 9$ y $n-2$ grados de libertad, $t_{\text{tabla}} = 2.31$) (véanse tablas 6 y 7). Tanto para la Epinefrina ($t_{\text{exp}} = 0.75$) como para la Lidocaína ($t_{\text{exp}} = 1.20$) se encuentra que $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$ y por lo tanto no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100, confirmando la exactitud del método.

Tabla 6. Porcentajes de recuperación para la Epinefrina

% Teórico	Resultado como porcentaje de recuperación		
Muestra 1-80	90.0	95.0	90.0
Muestra 2-120	100.0	103.4	103.4
Muestra 3-160	102.6	100.0	102.6
Recuperación media (n=9)	98.6		
Desviación estándar	5.5		
Coefficiente de variación (%CV)	5.6		

Tabla 7. Porcentajes de recuperación para la Lidocaína

% Teórico	Resultado como porcentaje de recuperación		
Muestra 1-75	98.7	98.4	98.0
Muestra 2-100	100.0	100.2	100.5
Muestra 3-125	99.8	100.2	100.4
Recuperación media (n=9)	99.6		
Desviación estándar	0.9		
Coefficiente de variación (%CV)	1.0		

t_{exp} es calculado como: $t_{exp} = \frac{|100 - R| \times \sqrt{n}}{CV}$ Siendo

do R la recuperación media y %CV el coeficiente de variación.

CONCLUSIONES

Siguiendo la metodología descrita anteriormente, es posible cuantificar en corto tiempo (15 minutos por muestra) y usando pequeñas cantidades de muestra (1 cámpul = 1.8 mL), Epinefrina y Lidocaína en cualquiera de las soluciones anestésicas inyectables de uso dental disponibles comercialmente. Además, como se observa en los cromatogramas, también es posible la cuantificación de benzoato de sodio.

A diferencia de la metodología propuesta en la monografía de la farmacopea norteamericana USP-26, la cuantificación de los principios activos es realizada en un solo análisis cromatográfico, usando un solo detector y con una fase móvil poco compleja.

Los productos que se obtienen al someter los principios activos y excipientes a la degradación

artificial realizada (oxidación, hidrólisis ácida y ataque por sulfitos) no interfieren con los picos de interés, por lo que el presente método puede ser utilizado para estudios de estabilidad de este medicamento.

La detección por UV tiene una sensibilidad menor comparada con la detección electroquímica (11) ésta es la sugerida por la USP para la determinación de Epinefrina, pero el método desarrollado presenta una precisión y exactitud (12, 9) adecuadas para determinar y cuantificar la Epinefrina en los inyectables anestésicos dentales a las concentraciones disponibles en el mercado.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar sus agradecimientos a New Stetic S.A. por la financiación y respaldo a este proyecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Haas D.A. (2002) An update on local anesthetics in dentistry. J. Can. Dent. Assoc. 68(9): 546-541.
- Stanley F. (2001) Manual de anestesia local. (Ed) Guanabara Koogans. 4ª ed pp 49-52.
- Leon M.E. (2001) Anestésicos locales en odontología. Colombia. Med. 32(3): 137-140.
- Waraszkiewicz S.M., Milano E.A., Dirubio R. (1981) Stability-Indicating High-Performance Liquid Chromatographic analysis of Lidocaine Hydrochloride and Lidocaine Hydrochloride with Epinephrine injectable solutions. Journal of Pharmaceutical Sciences. 70(11): 1215.
- Connors K.A., Amidon G.L. and Stella V.I. (1986) Chemical Stability of Pharmaceuticals. (Ed) John Wiley and Sons. 2ª ed pp 438-447.
- Foye O. W. (1986) Principios de Química Farmacéutica. (Ed). Reverté, S.A. 2da ed. pp 362 - 370
- Waraszkiewicz S.M., Milano E.A., Dirubio R. A Stability indicating LCEC method for Epinephrine and its application to the analysis of Lidocaine Hydrochloride injectable solutions. Astra Pharmaceutical Products. INC. Worcester, Massachusetts.
- The United States Pharmacopeia 26 and the National Formulary 21 (2003). The United States Pharmacopeia Convention.
- Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Validación de Métodos Analíticos. Monografía. pp 71 -73
- Bergmann G. Von Oepen B. y col. Improvement in the Definitions of Sensitivity and Selectivity. Anal. Chem. 1987, 59, 2522-2526
- Snyder R. LL.(1997) y col. Practical HPLC Method Development. (Ed). Willey- Interscience Publication. 2da. Ed pp 85.
- Guidance for industry Q2B validation of analytical procedures: Methodology. ICH.(1996).

Fecha de Recibo: Septiembre 10 de 2003

Fecha de Aceptación: Octubre 14 de 2003