

## Determination of atenolol in pharmaceutical dosages by Fourier transform infrared spectrometry (FTIR)

Carlos Ayala<sup>1</sup>, María del Rosario Brunetto<sup>1</sup>, Fernando Ovalles<sup>2</sup>  
y Máximo Galignani<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Espectroscopia Molecular, Departamento de Química, Facultad de Ciencias.

<sup>2</sup>Departamento de Análisis y Control, Facultad de Farmacia.

Universidad de Los Andes (ULA), Apartado Postal 440, Mérida 5101A,  
República Bolivariana de Venezuela. maximo@ula.ve

### Abstract

In this work, a simple and rapid alternative method for determining atenolol in solid pharmaceutical dosages has been developed. The method is based on the dissolution, or extraction, of the active principle with chloroform and direct analysis of standard and sample solutions by FTIR spectrometry. Quantification of the analyte was carried out at the 1512 (principal band) and 1300  $\text{cm}^{-1}$  bands, using as analytical signal the absorbance at 1512 and 1300  $\text{cm}^{-1}$ , respectively, corrected by mean appropriate baselines. The main figures of merit at the principal band (working range 0.1-1.0% (w/v), limit of detection ( $3\sigma$ ): 0.004% (w/v), limit of quantification ( $10\sigma$ ): 0.0125% (w/v), precision: 0.6% and sample throughput of 30 samples  $\text{h}^{-1}$ ) are attractive and really adequate for the proposed analysis. The accuracy of the method was certified by means comparative analysis of real samples using the official method described by the United States of America Pharmacopeia (USP). The method was satisfactorily applied to the determination of atenolol in a series of commercially available solid pharmaceutical samples. All the values obtained for the commercial samples were within the limit prescribed by the official pharmacopoeia.

**Key words:** Atenolol, FTIR spectrometry, pharmaceuticals.

## Determinación de atenolol en productos farmacéuticos por espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

### Resumen

En este trabajo se desarrolla una propuesta metodológica alternativa, simple y rápida, para la determinación de atenolol en productos farmacéuticos. El método se basa en la disolución, o extracción, del principio activo con cloroformo y análisis directo de los estándares y muestras por espectrometría infrarroja con transformada de Fourier. La cuantificación del analito se llevó a cabo, en paralelo, en las bandas del analito centradas en 1512 (banda principal) y 1300  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando como señal analítica la absorbancia a 1512 y 1300  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, corregida mediante líneas de base apropiadas. Las figuras de mérito del método en la banda principal (intervalo de trabajo: 0,1-1,0% (p/v), límite de detección ( $3\sigma$ ): 0,004% (p/v); límite de cuantificación ( $10\sigma$ ): 0,0125% (p/v), precisión: 0,6% y una frecuencia de análisis de 30 muestras  $\text{h}^{-1}$ ) resultan adecuadas para realizar el análisis propuesto. La exactitud del método se certificó mediante análisis comparativos de muestras reales con el método oficial descrito en la Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP). Se analizaron, de forma satisfactoria, diversos productos far-

macéuticos que se comercializan en el país. En todos los casos, la concentración encontrada está en el rango de tolerancia aceptado por la USP.

**Palabras clave:** Atenolol, espectrometría FTIR, fármacos.

## 1. Introducción

El atenolol, 2-[p-[hidroxi-3-(isopropilamino)propoxi]-fenil]acetamida (Figura 1), es un antagonista  $\beta$ -adrenceptor, perteneciente al grupo de los  $\beta$ -bloqueadores. Este tipo de drogas se utiliza, generalmente, en el tratamiento de desórdenes cardiovasculares como: arritmia cardíaca, infarto del miocardio, paro cardíaco congestivo, migraña e hipertensión [1, 2].

Este principio activo farmacéutico (PAF) fue introducido en el mercado en el año 1976, en reemplazo del propranolol, como anti-hipertensivo. Se administra por inyección intravenosa o por vía oral, mediante jarabes o tabletas con un contenido declarado que oscila entre 50 y 100 mg. En el tratamiento de la hipertensión se puede suministrar de forma aislada, o en preparaciones compuestas con otros antihipertensivos de tipo diurético [2]. Al igual que otros  $\beta$ -bloqueadores, el atenolol ha sido usado como agente de dopaje en actividades deportivas; razón por la cual el Comité Olímpico Internacional (COI) lo ha incluido en la lista de sustancias prohibidas [3].

Como cualquier producto farmacéutico, los fármacos que contienen atenolol deben pasar por un estricto control de calidad que verifique el contenido nominal del PAF, así como su uniformidad. Esto con el objeto de garantizar su eficacia.

La Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP) propone para este fin un método HPLC con detección UV [4]. Los métodos cromatográficos, por lo general, son precisos y exactos. Sin embargo, requieren instrumentación y accesorios costosos; y suelen tener un consumo elevado de reactivos, solventes y tiempo de análisis. Además, algunos de ellos han sido descritos como tediosos. Por estas razones, el desarrollo de nuevos métodos analíticos –simples, accesibles, sensibles y selectivos– para el análisis de PAF en fármacos representa una línea de investigación atractiva y de mucha vigencia. En esa vía, los nuevos diseños metodológicos hacen énfasis en algunos aspectos fundamentales, entre los que destacan: i) análisis directo (sin pre-tratamientos complejos de la

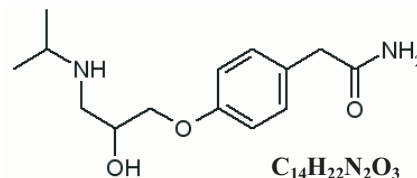


Figura 1. Estructura del atenolol.

muestra), ii) instrumentación accesible y de bajo costo (de adquisición y mantenimiento), iii) tiempos de análisis cortos, iv) mínimo consumo de reactivos, solventes y muestras (química verde) y v) que sea, o pueda ser, fácilmente automatizado. En la búsqueda de estos objetivos, se han propuesto métodos alternativos basados en técnicas electroanalíticas (potenciometría [5], voltametría [6, 7], etc.) y espectroscópicas (Absorción Molecular UV-visible [8-11], Fluorescencia Molecular [12-14] y Espectroscopia Infrarroja en el IR cercano (NIR) [15, 16], etc.), entre otras.

El atenolol presenta bandas de absorción características en el UV y en el infrarrojo medio (MIR). Sin embargo, en conocimiento de los autores –hasta el momento– no se ha descrito ningún método para su determinación en productos farmacéuticos, basado en la espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), con medidas de transmisión en el infrarrojo medio (MIR).

La espectrometría FTIR es una técnica espectroscópica poderosa y versátil, que ofrece selectividad y especificidad. Por ello, se ha convertido en una herramienta muy útil para el análisis de innumerables sustancias en muestras complejas, sin la necesidad de tratamientos complejos previos a la muestra [17]. En las últimas dos décadas se ha utilizado –de forma extensa y exitosa– en la industria farmacéutica, tanto en el área de investigación como de control [18, 19]. La sinergia entre esta técnica (FTIR) y la industria farmacéutica se debe a varios factores, entre los que destacan: i) la mayoría de los PAF absorben radiación IR, ii) la evolución de la técnica –en instrumentación y accesorios– ha brindado soluciones efectivas a muchos de sus problemas y iii) la concentración de los PAF en los productos farmacéuticos suele ser elevada.

El principal objetivo de este trabajo fue desarrollar un método alternativo –simple, rápido y accesible– basado en la Espectrometría FTIR, para la determinación de atenolol en formulaciones farmacéuticas sólidas; cuyas características básicas lo hacen competitivo frente al método oficial de análisis y accesible a todos los laboratorios de control de la industria farmacéutica.

## 2. Parte Experimental

### 1.1. Instrumentación

Todos los espectros de absorción fueron adquiridos con un espectrómetro FTIR Perkin Elmer (PE), modelo Spectrum 2000 (Nolwack, CT, USA) equipado con una fuente de radiación PE para trabajar en el MIR, un divisor óptico intercambiable (*beamsplitter*) de KBr, un detector de respuesta rápida de mercurio-cadmio-telurio (MCT-MIR) y una celda IR de transmisión estándar (CTIR) de geometría circular Wilmad (New Jersey, USA) con ventanas circulares (32 × 2 mm) de ZnSe. Esta celda es de tipo desmontable, con paso óptico variable. Este parámetro se fijó en 0,5 mm con un espaciador de PTFE (Teflón). El control del equipo, así como la adquisición y procesamiento de los espectros, se llevó a cabo con el software Spectrum 2000, de PE.

La unidad de trabajo se mantiene con un ambiente controlado –mediante acondicionadores de aire y des-humificadores– a una temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  y una humedad relativa de  $45 \pm 5\%$ .

Para la preparación de las muestras se utilizó un baño ultrasónico Branson, modelo 2100 (USA) y para el filtrado se usó un sistema de guarda columna con membranas de *nylon* de 13 mm de diámetro y 2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.

### 2.2. Reactivos, estándares y muestras

Los reactivos utilizados en este trabajo fueron de grado analítico. Se utilizó cloroformo estandarizado con etanol, calidad HPLC (T.J. Baker Xalostoc, México), como disolvente. Previo al análisis, el disolvente fue destilado y secado por varias horas sobre  $\text{CaCl}_2$  anhidro (BDH, Poole, Inglaterra) [20, 21]. Se preparó una solución patrón (1% (p/v)) de atenolol (Sigma Aldrich, 99,5% de pureza, St. Louis, USA), disolviendo la cantidad apropiada en cloroformo. Los estándares de trabajo,

entre 0,1 y 1,0% (p/v), fueron preparados en cada sesión de trabajo por dilución adecuada del patrón en el mismo medio.

Las muestras analizadas corresponden a productos farmacéuticos comerciales provenientes de cinco Laboratorios Farmacéuticos nacionales, que se encuentran disponibles en el mercado local. La presentación comercial de las mismas corresponde a tabletas que declaran un contenido de 50 y 100 mg del principio activo.

Para la preparación de las soluciones-muestra se toman inicialmente 10 tabletas del producto farmacéutico, se trituran y pulverizan –de forma manual– con la ayuda de un mortero, hasta obtener un fino polvo homogéneo representativo de la muestra. Se pesa la cantidad de polvo equivalente a 100 ó 50 mg de atenolol, y se coloca en un tubo de ensayo con tapa. A continuación se lleva a cabo el proceso de extracción sólido-líquido con 20 mL de cloroformo, colocando el recipiente en un baño ultrasónico por 15 minutos. Finalmente, la solución resultante se filtra para separar los excipientes insolubles, se transfiere el filtrado a un matraz de 25 mL y se lleva a aforo con el mismo disolvente. En este punto, la solución-muestra está lista para el análisis por FTIR.

Para el análisis cromatográfico de referencia, las muestras y la fase móvil (1-heptanosulfonato de sodio/fosfato dibásico de sodio anhidro/butilamina) se prepararon siguiendo rigurosamente el protocolo descrito en la USP [4].

### 2.3. Procedimiento general

La celda IR de medida se llena, de forma manual y secuencial, con el blanco (cloroformo), los estándares y las soluciones-muestra bajo evaluación; y se adquiere en cada caso el espectro FTIR correspondiente, acumulando 3 barridos (*scans*) a una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$ . Se procesan los espectros y la data espectral de interés. La concentración de atenolol se obtiene por interpolación de la señal analítica correspondiente a las soluciones-muestra en la curva de calibración simple construida a partir de los estándares, analizados y procesados en forma análoga a las muestras (ver sección 3.4.1). El estado de las ventanas de ZnSe, así como el paso óptico, se verificó periódicamente mediante el método tradicional, estableciendo el *background* –y adquiriendo el espectro– con la cel-

da vacía [22, 23]. La variación en el paso óptico en una sesión de trabajo típica, es inferior al 1% ( $b_{(n=3)} = 0,500 \pm 0,004$  mm).

### 2.3.1. Método de referencia

Los análisis de referencia se hicieron por HPLC con detección UV, utilizando el método descrito en la USP [4]. Se inyectan, de forma automática, 10  $\mu$ L de la muestra en el cromatógrafo, equipado con una columna *Nova Pack C18* (3,9  $\times$  300 mm) de 4,6  $\mu$ m d.p. (Waters) con un flujo de fase móvil de 0,6 mL  $\text{min}^{-1}$ . La señal de absorbancia se monitorea de forma continua a 226 nm.

## 3. Resultados y Discusión

### 3.1. Estudios preliminares.

#### Caracterización espectral del sistema

El cloroformo es un disolvente apropiado para llevar a cabo la determinación propuesta. El atenolol se disuelve fácilmente en  $\text{CHCl}_3$  hasta una concentración de 1,5% (p/v), lo cual permite preparar con comodidad los estándares y muestras de trabajo. Además, bajo las condiciones de trabajo seleccionadas, proporciona blancos de excelente calidad en varios intervalos espectrales: 825-1195  $\text{cm}^{-1}$ ; 1240-3000  $\text{cm}^{-1}$  y 3025-4000  $\text{cm}^{-1}$ , como se observa en las Figuras 2.1.

El espectro FTIR del atenolol en fase sólida (pastilla de KBr), que se ilustra en la Figura 2.2, muestra tres bandas anchas e intensas con máximos en 3514, 3401 y 2950  $\text{cm}^{-1}$ . De igual forma, en el intervalo comprendido entre 1000 y 1700  $\text{cm}^{-1}$ , se observa un segundo grupo de bandas centradas en 1645  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  -CO-N), 1512  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  =C-O), 1450  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  =C-O-C-), 1300  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta$  O-H), 1245  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta$  -C=C-H) y 1177  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta$  -C=C-H) [17, 22]. Por su parte, el comportamiento espectral del atenolol en cloroformo evidencia algunos cambios que son producto de las interacciones con el disolvente y, evidentemente, de las zonas opacas -o de pobre transparencia- del mismo. El cloroformo presenta bandas de absorción características a 3018; 1214; 740 y 667  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 2.1A), que afectan, obviamente, las ventanas de transparencia del solvente en esas zonas; y por ende, al blanco en el sistema utilizado en esas zonas específicas.

De esta forma, se observan ligeros desplazamientos en prácticamente todas las bandas, del analito, siendo este comportamiento notorio en las bandas de 3514 y 3401  $\text{cm}^{-1}$ , así como en la de 1645  $\text{cm}^{-1}$  que aparece centrada en 1671  $\text{cm}^{-1}$ . No obstante, la mayoría de las bandas se ven muy poco afectadas en este medio, probablemente por las características del disolvente, condición que las hace potencialmente útiles desde el punto de vista analítico.

### 3.2. Estudios de viabilidad de la propuesta metodológica

Para establecer la viabilidad de la propuesta de trabajo, se estudió el comportamiento espectral de dos estándares, una solución-muestra y la misma muestra fortalecida con el principio activo, en el intervalo espectral comprendido entre 1100 y 1600  $\text{cm}^{-1}$ . Como se puede observar en la Figura 3, en esta región se localizan varias bandas de interés. Sin embargo, algunas están cerca de zonas de absorción del disolvente (1177 y 1245  $\text{cm}^{-1}$ ), otras no están bien resueltas, en algunas se observan fuertes desplazamientos (1671  $\text{cm}^{-1}$ ) y otras son muy débiles; condiciones todas conducentes a potenciales errores analíticos.

Para el desarrollo de este trabajo se seleccionó la banda centrada en 1512  $\text{cm}^{-1}$  como banda principal y la de 1300  $\text{cm}^{-1}$  -de menor intensidad- como banda secundaria; ya que ambas lucen libres de interferencias. En todas las disoluciones usadas para este estudio, se observa -en ambas bandas- un crecimiento centrado, sin ningún tipo de deformación o desplazamiento ( $\lambda_{\text{Max}}$ , forma de la banda, etc.) que es consistente con la concentración del analito (Figuras 3B y 3C). Este comportamiento avala la viabilidad del método propuesto.

La señal analítica seleccionada, en ambos casos, fue la absorbancia en el máximo de absorción ( $\lambda_{\text{Max}}$ : 1512 y 1300  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente) con corrección mediante una línea de base apropiada: 1525-1494  $\text{cm}^{-1}$  y 1313-1282  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Esta modalidad de trabajo representa una forma de auto-evaluación del método y es una de las ventajas que ofrece la espectrometría FTIR.

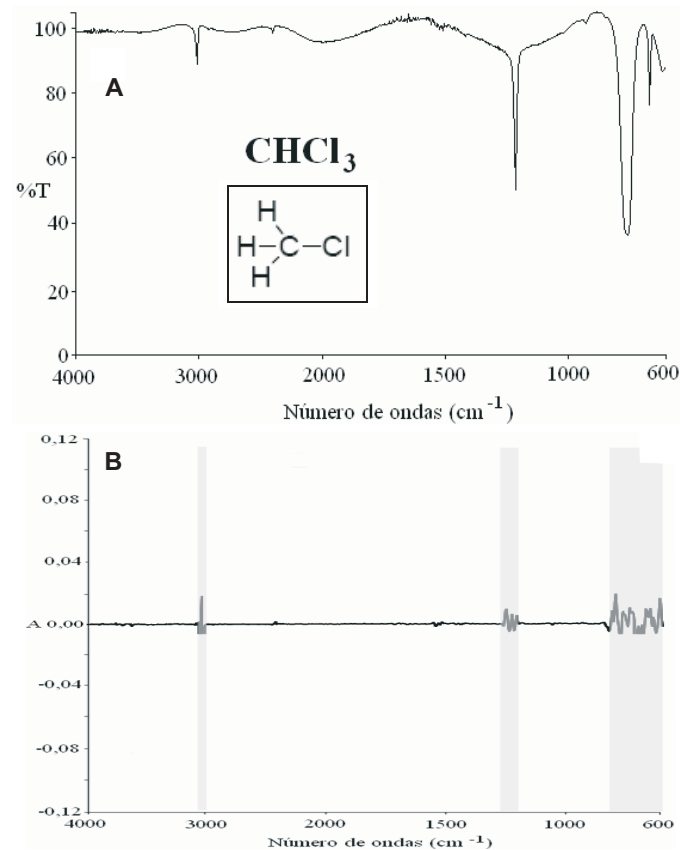


Figura 2.1. Comportamiento espectral del disolvente. **(A)** Espectro en film del cloroformo puro. El inserto de la Figura muestra la estructura del cloroformo. **(B)** Blanco del sistema-Zonas de transparencia del cloroformo bajo las condiciones de trabajo seleccionadas (*Background*: Cloroformo puro,  $n = 3$ ; paso óptico ( $b$ ) = 0,5 mm,  $R = 4 \text{ cm}^{-1}$ ).

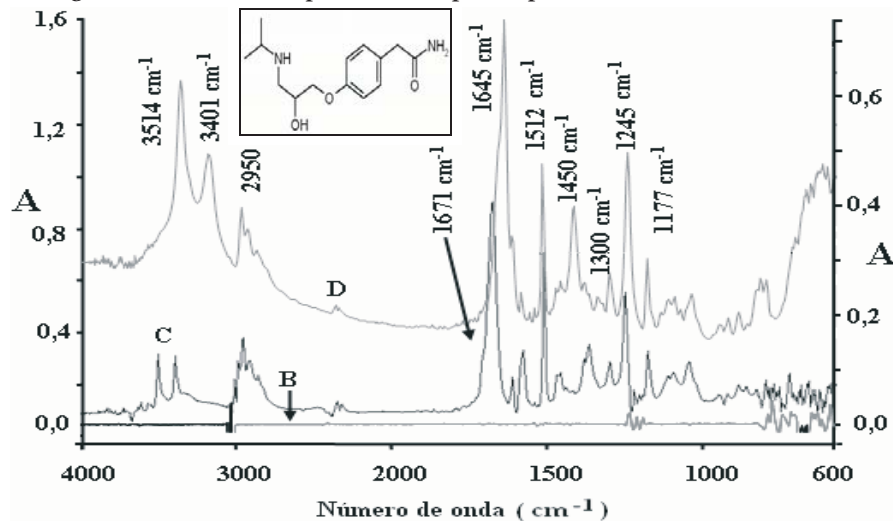


Figura 2.2. Espectros FTIR del principio activo farmacéutico (Atenolol). **(B)** Blanco del sistema utilizado\*. **(C)** Espectro FTIR correspondiente a un estándar de atenolol 0,4% (p/v) en cloroformo\* (B, C: ordenada del lado derecho). **(D)** Espectro en fase sólida (pastilla de KBr) del atenolol (ordenada del lado izquierdo). El inserto de la Figura presenta la estructura del atenolol. \*(Condiciones experimentales:  $R_N = 4 \text{ cm}^{-1}$ ; Paso óptico ( $b$ ) = 0,5 mm; *Background* = Cloroformo puro,  $n = 3$ ).

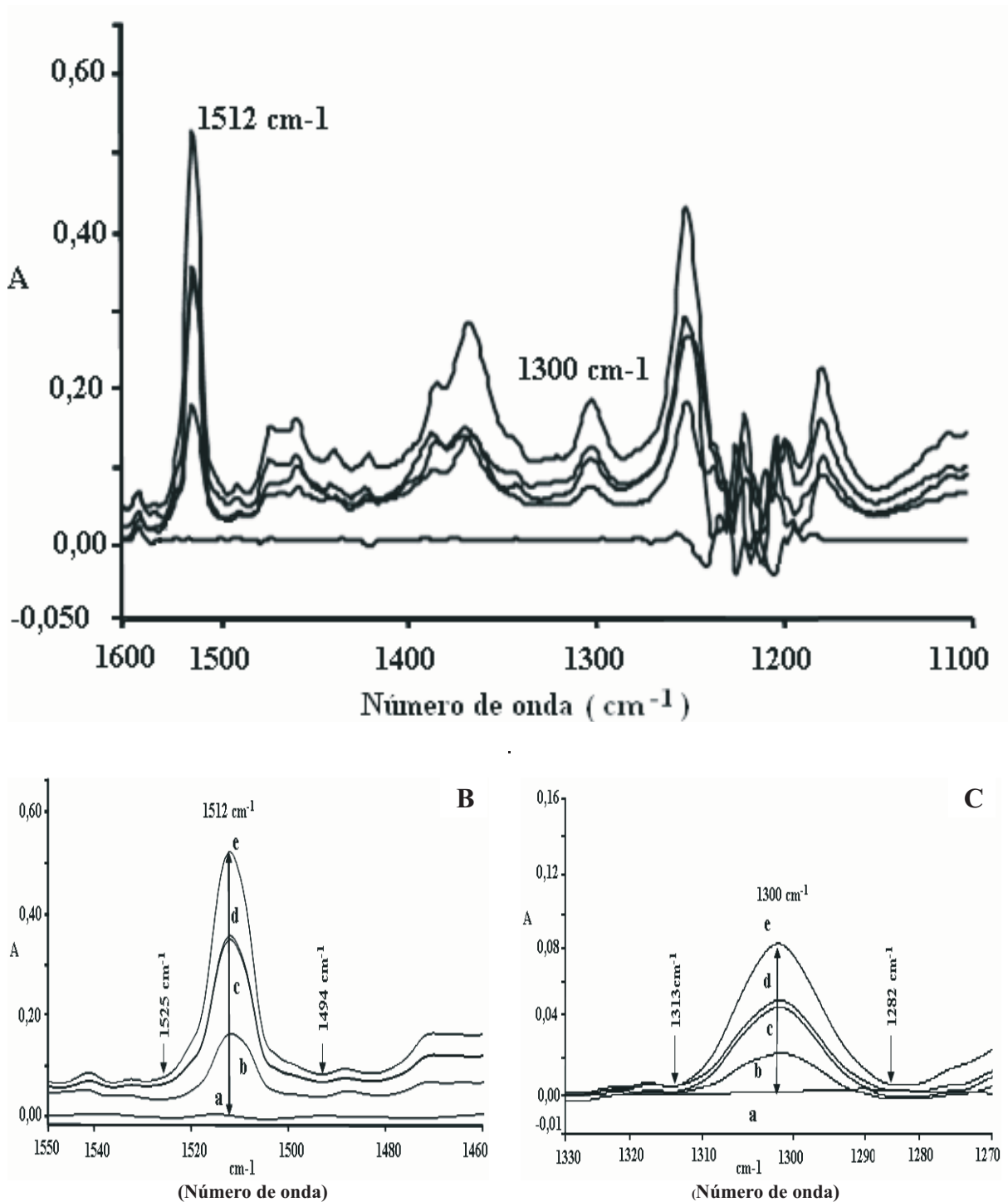


Figura 3. Comportamiento espectral de estándares y muestras. **(A)** Espectros FTIR correspondientes a: a) blanco, b) y c) estándares de atenolol (0,2 y 0,4% (p/v)), en cloroformo; d) solución-muestra ([Atenolol]  $\approx$  0,4% (p/v) y e) solución-muestra fortificada con atenolol. **(B)** y **(C)** Ampliación de las bandas de 1512  $\text{cm}^{-1}$  y 1300  $\text{cm}^{-1}$ , indicando los límites de las líneas de base. (Condiciones experimentales: Paso óptico (b) = 0,5 mm, *Background*:  $\text{CHCl}_3$  puro;  $n = 3$ ).



### 3.3. Optimización de parámetros experimentales

El método de análisis propuesto requiere la optimización del proceso de extracción del analito en la muestra, así como la selección de las condiciones instrumentales-espectroscópicas de operación del espectrómetro FTIR.

#### 3.3.1. Parámetros espectroscópicos-instrumentales

Se estudió la influencia que tienen sobre la señal analítica algunos parámetros inherentes a la espectrometría FTIR como son: la resolución y la acumulación de barridos (*scans*). De igual forma, se evaluaron las condiciones para establecer la señal de fondo, el *background*. Los estudios se realizaron usando dos referencias: un estándar de atenolol en cloroformo 0,4% (p/v) y una solución-muestra de concentración equivalente.

La experiencia obtenida en investigaciones previas [21, 24] indica que el número de interferogramas acumulados (*n*) es un parámetro que tiene poca influencia sobre la relación señal/ruido, cuando se utiliza cloroformo como disolvente. En este trabajo se evidenció el mismo comportamiento. Sobre esta base, se fijó el valor de *n* en 3, tanto para establecer el *background* como para la adquisición de los espectros correspondientes al blanco, a estándares y muestras. En estas condiciones se obtiene un blanco de calidad, sin mayores costos en el tiempo de análisis.

Con relación a la resolución nominal ( $R_N$ ), se estudió el efecto de este parámetro sobre la señal de las soluciones de referencia, en el intervalo de 2 a 32  $\text{cm}^{-1}$ . Como se puede observar en la Figura 4, la señal analítica (Abs en  $\lambda_{\text{max}}$ , corregida por línea de base) se mantiene prácticamente constante en el intervalo de 2 a 4  $\text{cm}^{-1}$ ; y a partir de ese valor disminuye de forma considerable.

Por otra parte, el tiempo de adquisición de los espectros decrece al aumentar el valor  $R_N$ . Sobre la base de estos resultados, se seleccionó un valor de 4  $\text{cm}^{-1}$  para el resto del trabajo.

#### 3.3.2. El proceso de extracción. Preparación de la solución-muestra

Las características químicas y físicas de las tabletas pueden variar de un producto a otro; ya que los excipientes y su concentración; así como

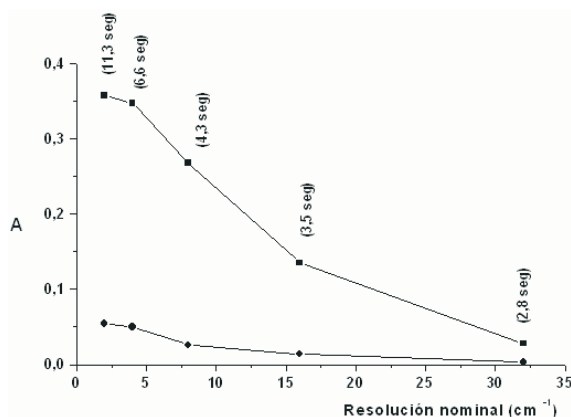


Figura 4. Efecto de la resolución nominal ( $R_N$ ) sobre la señal analítica de un estándar de atenolol en cloroformo. (●) banda de 1300  $\text{cm}^{-1}$ ; (■) banda de 1512  $\text{cm}^{-1}$ . ( $R_N$ : 2 – 32  $\text{cm}^{-1}$ ; [Atenolol] = 0,4% (p/v); *Background*:  $\text{CHCl}_3$ ;  $n = 3$ ).

sus propiedades físicas pueden diferir considerablemente en los distintos productos comerciales.

La primera etapa del método propuesto involucra la extracción (sólido-líquido) cuantitativa del analito presente en los comprimidos, usando  $\text{CHCl}_3$  como medio extractante. Para facilitar el lixiviado del principio activo, esta etapa se realizó en un baño ultrasónico; y se varió el tiempo de tratamiento con ultrasonido ( $t_{\text{Son}}$ ) entre 0 y 60 min. El estudio se realizó para todas las muestras evaluadas. Sin embargo, por razones de simplicidad, en la Figura 5 solo se muestra el comportamiento observado para dos muestras.

En ausencia de ultrasonido ( $t_{\text{Son}} = 0$ ), se observa una señal analítica significativa. Esto indica que una fracción importante del principio activo –presente en el sólido– pasa con facilidad al bulto de la solución extractante. A partir de ese punto, se observa un incremento en la señal con  $t_{\text{Son}}$ , hasta los 10 minutos. Para valores superiores, la señal analítica se hace independiente de este parámetro; lo que indica, en principio, una extracción cuantitativa. El uso de mayores tiempos no aporta ningún beneficio; y se traduce en un incremento en el tiempo de análisis.

Para corroborar la eficiencia del proceso de extracción, se comparó el espectro FTIR obtenido a partir de un estándar de atenolol 0,4% (p/v), preparado directamente en cloroformo, con el correspondiente a una solución-muestra de con-

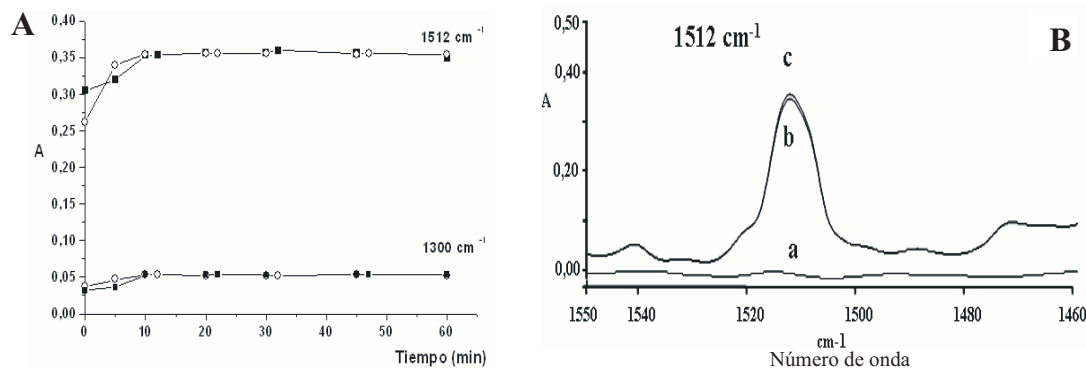


Figura 5. Optimización del proceso de extracción. **(A)** Efecto del tiempo de tratamiento ultrasónico ( $t_{\text{Son}}$ ) sobre la eficiencia del proceso de extracción: (O) Muestra 1, (■) Muestra 2; ( $t_{\text{Son}}$ : 0-60 min;  $[\text{Atenolol}]_{\text{Muestra (M1 y M2)}} \approx 0,4\%$  p/v). **(B)** Espectros FTIR correspondientes a: a) blanco ( $\text{CHCl}_3$ ); b) estándar de Atenolol 0,4% (p/v) en  $\text{CHCl}_3$  y c) solución-muestra de concentración equivalente, analizada por el método propuesto.

centración equivalente, preparada y analizada mediante el procedimiento descrito. No se observan diferencias significativas entre ambos espectros (Figura 5B), lo cual corrobora que el proceso de extracción fue cuantitativo.

### 3.4. Validación del método propuesto

Para establecer la confiabilidad de la propuesta metodológica, se procedió a validar el método de análisis. Para ello se realizaron experiencias dirigidas a caracterizar analíticamente el sistema, a estudiar posibles efectos interferentes por parte de la matriz y a evaluar la exactitud del mismo.

#### 3.4.1. Características analíticas del método propuesto

Bajo las condiciones de trabajo seleccionadas, se construyeron curvas de calibración simples (CCS) en las dos bandas seleccionadas. En ambos casos se encontró excelente proporcionalidad entre la señal analítica y la concentración de atenolol en el intervalo de 0 a 1,0% (p/v), concentración límite estudiada (concentración del patrón). Las ecuaciones de las rectas obtenidas por regresión lineal (blanco y 7 estándares), fueron:  $A_{(1512\text{ cm}^{-1})} = 9 \cdot 10^{-5} + 0,9032 [\text{Atenolol}]$  y  $A_{(1300\text{ cm}^{-1})} = 1 \cdot 10^{-4} + 0,1426 [\text{Atenolol}]$ , con coeficientes de correlación ( $r$ ) de 0,9997 y 0,998, respectivamente. Los límites de detección ( $3\sigma$ ) y cuantificación ( $10\sigma$ ), fueron de 0,004 y 0,0125% (p/v), respectivamente, para la banda de  $1512\text{ cm}^{-1}$ ; y de 0,025 y 0,083% (p/v) para la banda de  $1300$

$\text{cm}^{-1}$ . La frecuencia de análisis, sin tomar en cuenta la etapa de preparación de las muestras, es de aproximadamente 30 muestras  $\text{h}^{-1}$ .

La repetibilidad del método se evaluó mediante 5 réplicas de soluciones-muestra preparadas de forma independiente a partir de productos con 50 y 100 mg del analito. La desviación estándar relativa (DER) en la banda principal fue de 0,6% y 0,4%, respectivamente. Por su parte, la precisión intermedia (entre días) dio valores de 0,8% y 0,6%. El estudio equivalente, realizado en la banda de  $1300\text{ cm}^{-1}$ , mostró valores similares.

#### 3.4.2. Estabilidad de las soluciones de trabajo

La estabilidad de las soluciones de referencia se evaluó monitoreando su señal analítica por un periodo de tres horas. No se observaron variaciones significativas en ninguna de las bandas, lo cual es indicativo de la estabilidad de estándares y muestras; así como de la robustez de método.

#### 3.4.3. Efecto de matriz

La extracción del analito de la muestra con un disolvente orgánico permite la separación parcial del mismo de la matriz de la muestra, en una etapa previa a la detección espectrométrica. Por esta vía, se aísla al analito de potenciales interferentes presentes en la muestra (excipientes), sobre la base de la solubilidad diferencial que presentan el analito y los excipientes en las muestras bajo estudio, en cloroformo. Para corroborar la ausencia de efectos de matriz, se realizaron curvas de adición de estándar (CAE) en la



modalidad clásica: volumen de muestra constante, volumen de estándar variable y volumen final constante (Tabla 1).

Las pendientes de las curvas CAE no mostraron diferencias significativas con las correspondientes a las curvas CCS, en ninguna de las bandas. Estos resultados indican que el método propuesto está libre de interferencias de tipo físico y químico por parte de la matriz.

#### 3.4.4. Estudios de exactitud

Se realizó una estimación de la exactitud del método, analizando las soluciones usadas en las experiencias CAE bajo la óptica de estudios de recuperación. Los resultados obtenidos evidencian, en todos los casos, recuperación cuantitativa (97,5-102,5). Por otra parte, en las muestras analizadas por CAE (Tabla 1), la concentración de atenolol obtenida por ambos métodos de calibración (CCS y CAE) no mostró diferencias estadísticamente significativas.

Por último, se analizaron algunas muestras por el método descrito en la USP. La comparación estadística (pruebas F-Fisher y t-student) de los resultados obtenidos por ambos métodos, no mostró diferencias significativas [25]. Estos resultados corroboran la ausencia de interferencias de matriz y la exactitud del método; así como su confiabilidad, viabilidad y aplicabilidad.

#### 3.5. Análisis de muestras reales

Tras los excelentes resultados obtenidos en los estudios de validación, el método propuesto

fue aplicado a la determinación de atenolol en las formulaciones farmacéuticas sólidas (tabletas) descritas en la sección 2.2. El análisis se realizó en las dos bandas seleccionadas, utilizando la misma serie de soluciones-muestra y estándares. Por ello, las CCS para la bandas de 1512 y 1300  $\text{cm}^{-1}$  se construyeron en el mismo intervalo de concentración: 0-1,0% (p/v). Como se puede observar en la Tabla 2, la concentración de atenolol encontrada en las dos bandas es similar; y muestra en la mayoría de los casos una buena concordancia con los valores declarados en la etiqueta del producto. En todos los casos, la concentración encontrada, está en el rango de tolerancia aceptado por la USP ( $\pm 10\%$ ).

## 4. Conclusiones

En este trabajo se desarrolló una nueva propuesta metodológica para la determinación de atenolol en formulaciones farmacéuticas sólidas. La estrategia de trabajo utilizada, preparación de estándares y soluciones-muestra en cloroformo y análisis directo por espectrometría FTIR, propició el desarrollo de un método de análisis simple, rápido y robusto. Además, de muy bajo costo y accesible a muchos laboratorios. En relación al consumo de cloroformo, este se limita a la preparación de estándares y muestras; y comparado con otros métodos que utilizan disolventes orgánicos [4, 8-11], es razonablemente bajo. El uso de la espectrometría FTIR como técnica de detección, proporciona selectividad, rapidez y simplicidad al método. Las Figuras de mérito

Tabla 1  
Curvas de calibrado simples y de adición estándar

Bandas de Absorción	Ecuación Curva de Calibración Simple (CCS)	Ecuación Curva de Adición de Estándar (CAE) <sup>(a)</sup>	Concentración de atenolol <sup>(b)</sup> (CCS) - % (p/v)	Concentración de atenolol <sup>(c)</sup> (CAE) - % (p/v)
1300 $\text{cm}^{-1}$	$A = 1 \times 10^{-4} + 0,1426 C$	$A = 0,0114 + 0,1419 C^*$	$0,398 \pm 0,003^*$	$0,401 \pm 0,003^*$
	C: [Atenolol]% (p/v)	$A = 0,0057 + 0,1421 C^{**}$	$0,200 \pm 0,002^{**}$	$0,201 \pm 0,003^{**}$
1512 $\text{cm}^{-1}$	$A = 9 \times 10^{-5} + 0,9032 C$	$A = 0,0730 + 0,9050 C^*$	$0,402 \pm 0,003^*$	$0,403 \pm 0,003^*$
	C: [Atenolol]% (p/v)	$A = 0,0364 + 0,9040 C^{**}$	$0,201 \pm 0,003^{**}$	$0,201 \pm 0,003^{**}$

<sup>(a)</sup>Las CAE se construyeron agregando concentraciones conocidas de atenolol en el intervalo comprendido entre 0,05 y 0,8% (p/v), a una base de 2 mL de solución-muestra del producto farmacéutico. A continuación, la serie completa de soluciones preparadas se diluye y lleva a aforo a un volumen final de 10 mL con el disolvente orgánico. <sup>(b)</sup>Concentración de atenolol en la solución-muestra, obtenida por interpolación en la curva CCS. <sup>(c)</sup>Concentración de atenolol en la solución-muestra obtenida a partir de las curvas CAE. \*Muestras de 100 mg. \*\*Muestras de 50 mg. (Estas muestras provienen del mismo Laboratorio Farmacéutico; muestras 1.1 y 1.2 de la Tabla 2).

Tabla 2  
Análisis de Muestras Reales

Muestras Comerciales	Referencia (Etiqueta)	Referencia (HPLC)	Concentración de Atenolol (mg Atenolol por tableta)			
			FTIR (Método propuesto)			
			Banda de 1512 cm <sup>-1</sup>		Banda de 1300 cm <sup>-1</sup>	
			CCS	CAE	CCS	CAE
1-1	100 mg	100,6	100,8 ± 0,6	100,7 ± 0,9	99,8 ± 0,8	100,4 ± 0,9
1-2	50 mg	50,2	50,2 ± 0,5	50,3 ± 0,8	50,7 ± 0,6	50,3 ± 0,6
2-1	50 mg	-	49,8 ± 0,1	-	50,0 ± 0,4	-
3-1	100 mg	99,4	100,2 ± 0,3	-	99,1 ± 0,8	-
4-1	100 mg	94,0	95 ± 1	-	93 ± 1	-
4-2	100 mg	97,1	95,9 ± 0,9	-	96,2 ± 0,9	-
5-1	100 mg	100,3	100,5 ± 0,6	-	99,9 ± 0,7	-

to relacionadas con sensibilidad, precisión y exactitud; así como los resultados obtenidos en los estudios de estabilidad de las soluciones y en el paso óptico de la celda, confieren al método un perfil muy adecuado para ser utilizado en el control de calidad de este tipo de productos.

Nuevos estudios se están llevando a cabo con el fin de automatizar el método de análisis propuesto, incorporando en el diseño metodológico el uso de sistemas de flujo. De igual forma, se adelantan estudios para el diseño y desarrollo de métodos alternativos para la determinación de otros principios activos en productos farmacéuticos.

### Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento al CITEC (Centro de Innovación Tecnológica) de la Universidad de los Andes (ULA) por la elaboración de accesorios varios, fundamentales para el desarrollo del trabajo. De igual forma, agradecen al FONACIT y al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la ULA, por el apoyo brindado para la divulgación de trabajos, a través de sus respectivos Programas de Apoyo al Investigador.

El desarrollo de este trabajo fue co-financiado por el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) a través del Proyecto G-2005000641.

### Referencias Bibliográficas

1. Katzung B.G.; "Farmacología básica y clínica", Editorial El Manual Moderno, México 2005.
2. Goodman and Gilman.; "Las Bases farmacológicas de la terapéutica" Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Caracas, 1986.
3. World Anti-doping Agency(WADA), "The world anti-doping code, The 2005 prohibited list-International Standard", Lausanne, Switzerland, 2004.
4. Farmacopea de Los Estados Unidos de América USP 29 24<sup>th</sup> edición, 29<sup>th</sup> revisión, tomo I, (2006) 236-239.
5. Hassan S.M., Abou-Sekkina M.M., El-Ries M.A. and Wassel A.A.: "Polymeric matrix membrane sensors for sensitive potentiometric determination of some  $\beta$ -blockers in pharmaceutical preparations". J. Pharm. Biom. Anal., Vol. 32, N° 1 (2003) 175-180.
6. Goyal R.N. and Singh S.P.: "Voltammetric determination of atenolol at C<sub>60</sub>-modified glassy carbon electrodes". Talanta, Vol. 69, No 4 (2006) 932-937.
7. Goyal R.N., Gupta V.K., Oyama M. and Bachheti N.; "Differential pulse voltammetric determination of atenolol in pharmaceutical formulations and urine using nanogold modified indium tin oxide electrode". Electro-

- chemistry Communications, Vol. 8, No 1 (2006) 65-70.
8. Salem H.: "Spectrophotometric determination of  $\beta$ -adrenergic blocking agents in pharmaceutical formulations". *J. Pharm. Biom. Anal.*, Vol 29, No 3 (2002) 527-538.
  9. Gölcü A., Yücesoy C. and Serin S.: "Spectrophotometric determination of some beta-blockers in dosage forms based on complex formation with Cu(II) and Co(II)". *Il Farmaco*, Vol. 59, No 6 (2004) 487-492.
  10. Bonazzi D., Gotti R., Andrisano V. and Cavrini V.: "Derivative UV spectrophotometric determination of atenolol and metoprolol in single-and multi-component pharmaceutical dosage forms". *Il Farmaco Convegno su Recenti Sviluppi ed. Applicazioni nell'Analisi Farmaceutica* No 6, Milano, Italie. Vol. 51, No 11 (1996) 733-738.
  11. Al-Ghannam S.M.: "A simple spectrophotometric method for the determination of  $\beta$ -blockers in dosage forms". *J. Pharm. Biom. Anal.*, Vol. 40, No 1 (2006) 151-156.
  12. Murillo Pulgarín J.A., Alañón Molina A. and Fernández López P.: "Simultaneous determination of atenolol, propranolol, dipyridamole and amiloride by means of non-linear variable-angle synchronous fluorescence spectrometry". *Anal. Chim. Acta*, Vol. 370, No 1 (1998) 9-18.
  13. Murillo Pulgarín J.A., Alañón Molina A. and Fernández López P.: "Simultaneous direct determination of amiloride and triamterene in urine using isopotential fluorometry". *Anal. Biochem.*, Vol. 292, No 1 (2001) 59-68.
  14. Cao Y.Z., Mo C.Y., Long J., G. Chen H., Wu H.L. and Yu R.Q.: "Spectrofluorometric resolution of closely overlapping drug mixtures using chemometrics methods". *Anal. Sci.*, Vol. 18 (2002) 333-336.
  15. Tran C.D., Oliveira D. and Grishko V.I.: "Determination of enantiomeric compositions of pharmaceutical products by near-infrared spectrometry". *Anal. Biochem.*, Vol 325, No 2 (2004) 206-214.
  16. Petri J., Kaunzinger A., Niemoller A. and Karas M.: "Quality control of tablets by Near Infrared (NIR)-Spectroscopy". *Pharmazie*, Vol. 10, No 1 (2005) 743-746.
  17. Ferraro J.R. and Basile J.L.: "Fourier transform Infrared Spectroscopy. Application to Chemical Systems". Academic Press, New York, 1978.
  18. Galignani M. and Brunetto M.R.: "Infrared detection in flow analysis". *Talanta*, Vol. 64, No 5 (2004) 1127-1146.
  19. N. Clark; "The analysis of pharmaceutical substances and formulated products by vibrational spectroscopy", pp. 3574-3589, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (Eds. J.M. Chalmers, P.R. Griffiths), Vol. 5: Applications in Life, Pharmaceutical and Natural Sciences (Pharmaceutical Applications), John Wiley & Sons, Chichester, UK (2002).
  20. Tipparat P., Lapanantnoppakuhun S., Jakmunee J. and Grudpan K., "Determination of ethanol by near infrared spectrometry with flow injection", *Talanta* 53 (2001) 1199-1204.
  21. Galignani M\*, Ayala C., Brunetto M., Burguera J.L. and Burguera M.: "A simple strategy for determining ethanol in all type of alcoholic beverages based on its on-line liquid-liquid extraction with chloroform, using a flow injection system and Fourier transform infrared spectrometric detection in the mid-IR". *Talanta*, Vol. 68 No 2 (2005) 470-479.
  22. Coonley R.T.; "Espectroscopia infrarroja". Segunda edición. Primera edición española. Editorial Alambra. S.A. Madrid, España (1988).
  23. Skoog D.A., Leary J.; "Análisis Instrumental", editorial Mc. Graw Hill, 4<sup>ta</sup> edición, Madrid, España 1994.
  24. Galignani M\*, Torres M., Ayala C. and Brunetto M.R.: "Determinación de cafeína en café mediante espectrometría infrarroja de transformada de Fourier". *Rev. Tec. Ing. Univ. Zulia*, Vol. 31, No 2 (2008) 159-168.
  25. Miller J.C. and Miller J.N.: "Statistic for Analytical Chemistry". Wiley (Ed.), New York, 1984.

Recibido el 7 de Diciembre de 2008

En forma revisada el 7 de Septiembre de 2009