

TRABAJOS ORIGINALES ORIGINALS WORKS

Dos sencillos métodos espectrofotométricos para la determinación de la citarabina y de su formulación inyectable

Two simple spectrophotometric methods for the determination of cytarabine and its injection formulation

SUBRAMANIAN N, AND MURTHY RSR*

Department of Pharmacy, Faculty of Technology and Engineering, M.S.University of Baroda, Kalabhavan, Vadodara -390001, India

*Autor de contacto. Dirección de contacto: Department of Pharmacy, Faculty of Technology and Engineering, M.S.University of Baroda, Kalabhavan, Vadodara-390001, India Teléfono: 091-265-2434187 / 2794051
Correo electrónico: murthyrsr@satyam.net.in

RESUMEN

Se han desarrollado dos rápidos y sencillos métodos de espectrofotometría ultravioleta para la estimación de citarabina en agua destilada (M_1) y metanol (M_2). Estos métodos se han comparado con el método de cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) descrito en la farmacopea de Estados Unidos. Se han establecido parámetros analíticos como la estabilidad, la exactitud y la precisión de ambos métodos y se han evaluado estadísticamente dichos parámetros para determinar las aplicaciones de los dos métodos. Ambos métodos presentaron ventajas en cuanto a su simplicidad, estabilidad, reproducibilidad y exactitud frente a los métodos no espectrofotométricos existentes utilizados para los análisis comunes del fármaco de formulaciones farmacéuticas.

PALABRAS CLAVE: Citarabina, Espectrofotometría ultravioleta, Agente anticancerígeno.

ABSTRACT

Two rapid and simple ultraviolet spectrophotometric methods for the estimation of cytarabine in distilled water (ME_1) and methanol (ME_2) has been developed and has been compared with the high performance liquid chromatographic method (HPLC) reported in the United States Pharmacopoeia. Analytical parameters such as stability, accuracy and precision have been established for both the methods and evaluated statistically to assess the applications of the two methods. Both the methods were found to have the advantages for simplicity, stability, reproducibility and accuracy for using as an alternate to the existing non-spectrophotometric methods for the routine analysis of the drug in pharmaceutical formulations.

KEY WORDS: Cytarabine. Ultraviolet spectrophotometry. Anti cancer agent.

INTRODUCCIÓN

La citarabina, de nombre químico 4-amino-1-β-D-arabinofuranosil-2(1H)-pirimidinona, es uno de los antimetabolitos más importantes utilizados en el tratamiento de la leucemia mielocítica aguda¹. Esta sustancia constituye el agente simple anticancerígeno más efectivo para la inducción de la remisión de esta en-

INTRODUCTION

Cytarabine, chemically 4-amino-1-β-D-arabinofuranosyl-2(1H)-pyrimidinone, is one of the most important antimetabolites used in the therapy of acute myelocytic leukemia¹. It is the single most effective anti cancer agent for the induction of remission in this disease. Cytarabine is also used in acute granulocytic and

fermedad. La citarabina también se emplea en el tratamiento de la leucemia linfática aguda y la leucemia granulocítica aguda²⁻⁵. La citarabina actúa en la fase S del ciclo celular inhibiendo la síntesis de ADN y provocando la muerte celular¹. Se conocen varios métodos para la determinación de este fármaco, como la HPLC⁶, la volumetría potenciométrica no acuosa⁷⁻⁹ y la quimioluminiscencia¹⁰. En este estudio se han utilizado dos sencillos métodos de espectrofotometría ultravioleta para la determinación de citarabina en agua destilada y metanol. También se ha realizado una evaluación estadística de los métodos propuestos^{11,12}.

MATERIALES Y MÉTODOS

Instrumentos:

Se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible Shimadzu modelo UV-1601 con celdas de 1 cm para todas las mediciones del espectro electrónico, y un sistema Shimadzu 10AVP HPLC para los análisis realizados mediante el método de cromatografía de líquidos.

Productos químicos:

La citarabina fue un amable regalo de Dabur Research Foundation (Ghaziabad, India) y se utilizó sin una posterior purificación. La pureza de la citarabina se evaluó mediante análisis HPLC en los que se obtuvo un pico único que confirmaba la ausencia de cualquier impureza. Metanol grado HPLC (S.D. Fine Chem. Ltd. Boisar). Soluciones madre de citarabina (i) SM₁ (100 µg ml⁻¹) preparada mediante disolución de 10 mg de citarabina en 100 ml de agua destilada (ii) SM₂ (100 µg ml⁻¹) preparada mediante disolución de 10 mg de citarabina en 100 ml de metanol. Se tomaron todas las precauciones necesarias al utilizar el metanol. Los experimentos se realizaron a temperatura controlada y se utilizaron recipientes de vidrio con tapón para reducir la evaporación del metanol y evitar su inhalación.

acute lymphatic leukemia²⁻⁵. Cytarabine acts on the S phase of the cell cycle thereby inhibit the DNA synthesis and lead to cell death¹. Various methods have been reported for its determination like HPLC method⁶, non-aqueous potentiometric method⁷⁻⁹ and chemiluminescence method¹⁰. In this study, two simple ultra violet spectrophotometric methods for the determination of cytarabine in distilled water and in methanol has been reported. Statistical evaluation of the proposed methods was also carried out^{11,12}.

MATERIALS AND METHODS

Instrument:

A Shimadzu model UV-1601 UV-VIS spectrophotometer with 1.0 cm matched cells was used for all electronic spectral measurements, Shimadzu 10AVP HPLC system was used for liquid chromatographic analysis.

Chemicals:

Cytarabine was kindly gifted by Dabur Research Foundation, Ghaziabad and was used without further purification. The purity of cytarabine was confirmed by HPLC analysis; single peak ascertains the absence of any impurity. Methanol of HPLC grade (S.D. Fine Chem. Ltd. Boisar); stock solutions of cytarabine (i) SS₁ (100 µg ml⁻¹) prepared by dissolving 10 mg of cytarabine in 100 ml of distilled water (ii) SS₂ (100 µg ml⁻¹) prepared by dissolving 10 mg of cytarabine in 100 ml of methanol. All the precautions were taken while using methanol. The experiments were conducted at controlled temperature and stoppered glass wares were used to reduce the evaporation of methanol and preventing inhalation of methanol.

Preparation of calibration curve

For ME₁:

Suitable aliquots (0.5 – 5 ml) of the stock solution SS₁ were pipetted into 10 ml volumetric flasks and the volume was made up to 10 ml with distilled water to give final concentra-

Preparación de la curva de calibración

Para M_1 :

Se introdujeron con una pipeta las alícuotas necesarias (0,5 – 5 ml) de la solución madre SM_1 en matraces volumétricos de 10 ml y el volumen se completó con agua destilada hasta los 10 ml para obtener unas concentraciones finales de 5, 10, 20, 30, 40 y 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Se agitaron bien las soluciones y se midió su absorbancia a 272 nm utilizando agua destilada como blanco.

Para M_2 :

Se introdujeron con una pipeta las alícuotas necesarias (0,5 – 5 ml) de la solución madre SM_2 en matraces volumétricos de 10 ml y el volumen se completó con metanol hasta los 10 ml para obtener unas concentraciones finales de 5, 10, 20, 30, 40 y 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Se agitaron bien las soluciones y se midió su absorbancia a 274 nm utilizando metanol como blanco.

El procedimiento anterior se repitió seis veces con ambos métodos. Se tabularon los valores de absorbancia media, junto con los valores de regresión (método de los cuadrados mínimos) y los datos estadísticos correspondientes a los métodos M_1 y M_2 . Se comprobó la linealidad mediante la prueba de falta de ajuste. Para comprobar el significado estadístico de la falta de ajuste, se utilizó el valor F calculado del siguiente modo.

$$F = (CM_{\text{Falta de ajuste}}) / (CM_{\text{error puro}})$$

donde $CM_{\text{Falta de ajuste}}$ y $CM_{\text{error puro}}$ son los cuadrados medios de la falta de ajuste y del error puro, respectivamente.

Estabilidad:

Para evaluar la estabilidad de las soluciones de citarabina, utilizada para la preparación de las curvas de calibración en ambos métodos, se observaron los cambios de absorbancia a sus longitudes de onda analíticas respectivas durante un período de 24 horas a temperatura ambiente. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para comprobar si los cambios de absorbancia ocurridos en el período de 24 horas eran estadísticamente signifi-

caciones de 5, 10, 20, 30, 40 and 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$. The solutions were shaken well and their absorbances measured at 272 nm using distilled water as blank.

For ME_2 :

Suitable aliquots (0.5 – 5 ml) of the stock solution SS_2 were pipetted into 10 ml volumetric flasks and the volume was made up to 10 ml with methanol to give final concentrations of 5, 10, 20, 30, 40 and 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$. The solutions were shaken well and their absorbances measured at 274 nm using methanol as blank.

The above procedure for both the methods was repeated six times. Mean absorbance values along with the regressed values (method of least squares) and statistical data for the methods ME_1 and ME_2 are tabulated. The linearity was tested by lack of fit test. The F value was used to the test the statistical significant of the lack of fit was constructed as follows.

$$F = (MS_{\text{Lack of fit}}) / (MS_{\text{pure error}})$$

where $MS_{\text{Lack of fit}}$ and $MS_{\text{pure error}}$ are the mean of squares of the lack of fit and the pure error term, respectively.

Stability:

Stability of the solutions of cytarabine, used for preparing the calibration curves in both the methods, was ascertained by observing for changes in the absorbances at their respective analytical wavelengths over a period of 24 h at room temperature. ANOVA was performed to check differences in absorbance over the period of 24 h are statistically significant. The stability of the solution was also analyzed by HPLC method.

Precision and accuracy:

In order to determine precision and accuracy of the methods, solutions containing known amounts of pure drug were prepared and analyzed in three replicates. Drug was also analyzed from the cytarabine injection (Cytarine

ficativos. La estabilidad de la solución también se analizó mediante el método HPLC.

Precisión y exactitud:

Para determinar la precisión y la exactitud de cada método, se prepararon y analizaron en tres réplicas soluciones que contenían cantidades conocidas de fármaco puro. También se analizó en tres réplicas el fármaco de la inyección de citarabina (inyección de citarabina de 100 mg, Dabur Pharmaceuticals, Solan, India).

Comparación con el método HPLC:

Se analizaron las muestras de citarabina inyectable mediante el método HPLC descrito en la farmacopea de Estados Unidos⁶. Resumen de las condiciones experimentales: Se utilizó una mezcla filtrada y desgasificada de tampón de fosfato y metanol (95:5) como fase móvil. Preparación estándar — Se disolvió en agua una cantidad pesada con precisión de citarabina (sustancia de referencia de la USP) que se diluyó con agua para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,1 mg por ml. Solución de resolución — Se disolvió una cantidad pesada con precisión de uracil arabinosida (sustancia de referencia de la USP) en la preparación estándar para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,1 mg por ml. Preparación de ensayo - Se introdujo un volumen de solución de citarabina medido con precisión equivalente a unos 100 mg de citarabina en un matraz volumétrico de 100 ml y, a continuación, se diluyó la solución con agua y se mezcló. El cromatógrafo de líquidos estaba provisto de un detector de 254 nm y de una columna de 4,6 mm x 25 cm con un lote L1 (octadecil silano unido químicamente a micropartículas cerámicas o silíceas porosas con un diámetro de entre 3 y 10 μm , Hypersil, Thermaquest, Cheshire, Reino Unido). La velocidad de flujo era de aproximadamente 1,0 ml por minuto. Los tiempos de retención relativa aproximada de la citarabina y del uracil arabinosido fueron de 1,0 y 1,3 respectivamente, y la

inyección 100mg, Dabur Pharmaceuticals, Solan, India) in three replicates.

Comparison with Pharmacopoeial method:

Samples of cytarabine injection were estimated using HPLC method as described in the United States Pharmacopoeia⁶. The experimental conditions are briefly as follows. Filtered and degassed mixture of phosphate buffer and methanol (95:5) was used as mobile phase. Standard preparation — An accurately weighed quantity of USP Cytarabine RS was dissolved in water, and diluted with water to obtain a solution having a known concentration of about 0.1 mg per ml. Resolution solution — An accurately weighed quantity of USP Uracil Arabinoside RS was dissolved in standard preparation to obtain a solution having a known concentration of about 0.1 mg per ml. Assay preparation - An accurately measured volume of cytarabine solution, equivalent to about 100 mg of cytarabine to a 100 ml volumetric flask and diluted with water and mixed. The liquid chromatograph was equipped with a 254 nm detector and a 4.6 mm x 25 cm column that contains L1 (Octadecyl silane chemically bonded to porous silica or ceramic microparticles, 3 to 10 μm in diameter, Hypersil, Thermaquest, Cheshire, U.K.) packing. The flow rate was about 1.0 ml per minute. The relative retention times were about 1.0 for cytarabine and 1.3 for uracil arabinoside, and the resolution, R, between cytarabine and uracil arabinoside was not less than 2.5. About 10 μl of standard preparation and assay preparation was injected separately into the chromatograph. The chromatograms were recorded and the responses for the major peaks were measured. The relative standard deviation for replicate injections was not more than 2.0. The results obtained by the pharmacopoeial method were compared with the spectrophotometric methods by using Student 't' test.

Ruggedness:

The ruggedness of an assay method is defined as degree of reproducibility of assay results obtained by analysis of the same sample under variety of normal test conditions

resolución (R) entre la citarabina y el uracil arabinosido no fue inferior a 2,5. Se inyectaron por separado en el cromatógrafo unos 10 μl de preparación estándar y preparación de ensayo. Se registraron los cromatogramas y se midieron las respuestas de los picos principales. La desviación estándar relativa obtenida para las réplicas de formulación inyectable no fue superior a 2,0. Los resultados obtenidos con el método HPLC se compararon con los de los métodos espectrofotométricos mediante la prueba de t-Student.

Resistencia:

La resistencia de un método de ensayo se define como el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos en el ensayo al analizar una misma muestra en distintas condiciones de análisis normales tales como diferentes laboratorios, instrumentos y analistas. Para validar la reproducibilidad de los métodos espectrofotométricos desarrollados (M_1 y M_2) en diferentes laboratorios (Formulation and development [L_1], Quality assurance [L_2] y Analytical [L_3]) por distintos analistas (A_1 , A_2 y A_3), se analizaron soluciones que contenían una cantidad conocida de fármaco puro (10 μg). Se analizaron los resultados obtenidos mediante la prueba ANOVA de una dirección para comprobar la existencia de diferencias estadísticamente significativas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La citarabina disuelta en agua destilada produce un espectro característico en el rango ultravioleta comprendido entre 200 y 400 nm. En la Figura 1 se observa la absorción máxima a 272 nm (Tabla 1). Se obtuvo una absorptividad de $9683 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 272 nm, longitud de onda que se eligió como longitud de onda analítica.

Al utilizar el método de análisis M_2 se empleó un baño de ultrasonidos para garantizar una rápida y completa solubilización del fármaco. La citarabina disuelta en metanol produce un espectro característico en el rango ultravioleta comprendido entre 200 y 400 nm. En las figuras 1 y 2 se muestra la absorptividad

such as different labs, different instruments, and different analysts. The developed spectrophotometric methods (ME_1 and ME_2) were validated for its reproducibility in different laboratories (Formulation and development [L_1], Quality assurance [L_2] and Analytical [L_3]) by different analysts (A_1 , A_2 and A_3) by testing solutions containing known amount of pure drug (10 μg). The results obtained were analysed for statistical difference between them using one way ANOVA.

RESULTS AND DISCUSSION

Cytarabine in distilled water yields a characteristic spectrum when scanned in the ultraviolet range between 200 and 400 nm. The scan (Fig. 1) shows absorption maximum at 272 nm (Table 1). The absorptivity at 272 nm was found to be $9683 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and this wavelength was chosen as the analytical wavelength.

Bath sonicator was employed when method ME_2 was used for estimation to ensure quick and complete solubilization of the drug. Cytarabine in methanol yields a characteristic spectrum when scanned in the ultraviolet range between 200 – 400 nm. Absorptivity scans over the UV wavelength range between 200 and 400 nm for $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ solution of cytarabine in distilled water and methanol are shown in Figs 1 and 2, respectively. The scan (Fig. 2) shows absorption maxima at 209 and 274 nm (Table 1). Though the absorptivity at 209 nm was high it was not selected as analytical wavelength due to its proximity to the lower limit of the UV transparent region of methanol. The absorptivity at 274 nm ($8829 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) was found more suitable and hence was selected for further investigations. Correlation coefficients for ME_1 and ME_2 were found to be 0.9997 and 0.9998, respectively signifying that a linear relationship existed between absorbance and concentration of the drug. The lack of fit test was also carried out to prove the linear relationship and the F values for ME_1 and ME_2 was found to be 1.024 and 2.519, respectively (critical F value for methods ME_1 and ME_2 was 3.52), which confirms that the deviation from the linearity is not statistically significant.

en un rango de longitud de onda ultravioleta de 200 a 400 nm de una solución de $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ de citarabina disuelta en agua destilada y metanol, respectivamente. En la Figura 2 se observa la absorción máxima a 209 y 274 nm (Tabla 1). Aunque la absorción a 209 nm era alta, esta longitud de onda no se seleccionó como longitud de onda analítica debido a su proximidad al límite inferior de la región transparente UV del metanol. La absorción a 274 nm ($8829 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) se consideró más adecuada y se seleccionó, por tanto, para posteriores investigaciones. Se obtuvieron coeficientes de correlación de 0,9997 y 0,9998 para M_1 y M_2 , respectivamente, que demostraban la existencia de una relación lineal entre la absorbancia y la concentración del fármaco. También se realizó la prueba de falta de ajuste para comprobar la relación lineal y se obtuvieron valores F de 1,024 y 2,519 para M_1 y M_2 , respectivamente (con un valor F crítico de 3,52 para ambos métodos), lo que confirma la inexistencia de una desviación de la linealidad significativa.

FIGURA 1. Longitud de onda de la citarabina en agua destilada.

FIGURE 1. Wavelength scan of cytarabine in distilled water.

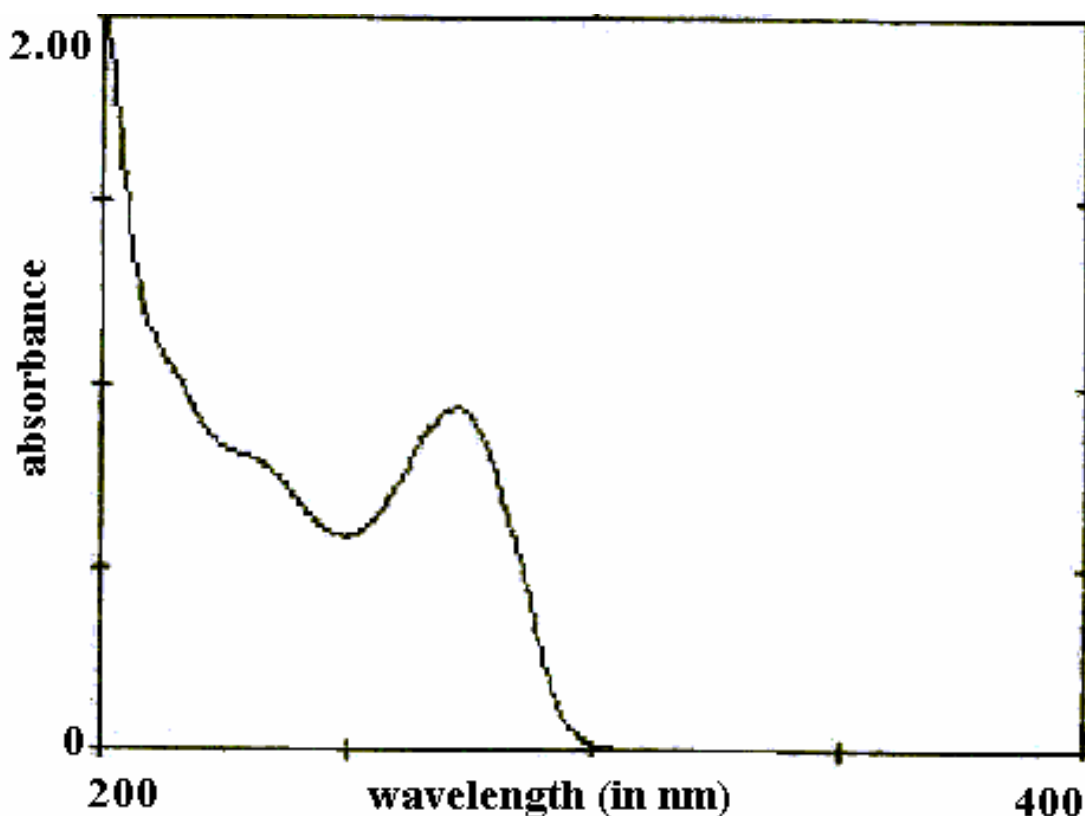
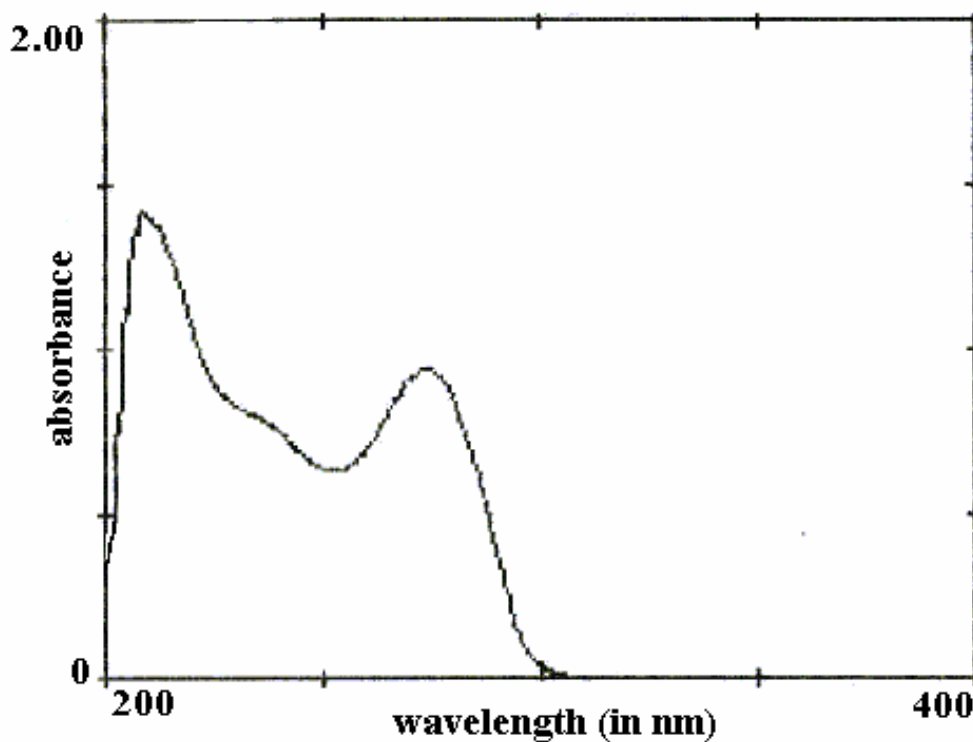


FIGURA 2. Longitud de onda de la citarabina en metanol.**FIGURE 2.** Wavelength scan of cytarabine in methanol.**TABLA 1.** Características ópticas de la citarabina en agua destilada y metanol.**TABLE 1.** Optical characteristics for cytarabine in distilled water and methanol.

Características	En agua destilada	En metanol
Absorción máxima (nm) <i>Absorption maxima (nm)</i>	272*	209, 274*
Límites de Beer ($\mu\text{g ml}^{-1}$)** <i>Beer's limits</i>	5 - 50	5 - 50
Absortividad molar aparente** <i>Apparent molar absorptivity**</i> ($\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	9683	8829

*longitud de onda analítica para los métodos propuestos

**a la longitud de onda analítica

*Analytical wavelength for proposed method

**At analytical wavelength

TABLA 2. Valores de absorbancia media, valores de regresión y datos estadísticos de la curva de calibración para la estimación de la citarabina en agua destilada (M_1).

TABLE 2. Mean absorbance values, regressed values and statistical data of the calibration curve for the estimation of cytarabine in distilled water (ME_1).

Concentración <i>Concentration</i> ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Absorbancia media* (\pm E.E.) <i>Mean Absorbance*</i> (\pm S.E.)	Valor de regresión** <i>Regressed</i> <i>Value**</i>
5	0,189 \pm 0,0095	0,194
10	0,379 \pm 0,0071	0,392
20	0,813 \pm 0,0054	0,787
30	1,191 \pm 0,0068	1,182
40	1,553 \pm 0,0081	1,577
50	1,978 \pm 0,0048	1,972

Ecuación de regresión**

Ordenada en el origen (a) = $-3,4 \times 10^{-3}$;

Pendiente (b) = $3,95 \times 10^{-2}$;

Coefficiente de correlación = 0,9997;

n = 36.

*media de seis valores

**utilizando la ecuación de regresión

Se cumplió la ley de Beer entre 5 y 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ tanto en M_1 como en M_2 . Se realizó un análisis de regresión de los datos experimentales. En las tablas 2 y 3 se muestran los datos no procesados y los resultados del análisis de regresión (método de mínimos cuadrados) para la estimación de citarabina en agua destilada y metanol, respectivamente. Las ecuaciones de regresión obtenidas para M_1 y M_2 fueron $y = 0,0395x - 0,0034$ e $y = 0,0355x + 0,015$, respectivamente. La varianza de la variable de respuesta $S^2_{y,x}$ obtenida para el método M_1 fue de $3,9 \times 10^{-5}$ y la obtenida para el método M_2 fue de $2,6 \times 10^{-4}$. Estos valores bajos indican la proximidad de los puntos experimentales a la línea de mínimos cuadrados. Estos resultados coinciden con los valores bajos del error estándar de absorbancia media de las soluciones que se utilizan para la preparación de la curva de calibración. La varianza de la pendiente S_b^2 fue de $2,56 \times 10^{-7}$ para M_1 y $1,696 \times 10^{-7}$ para M_2 . La pendiente de la línea de regresión de M_1 (0,395) y M_2 (0,55) indica que los dos métodos son igualmente sensibles y que la ley de Beer se cumple en ambos en

Beer's law was obeyed between 5 and 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for both ME_1 and ME_2 . Regression analysis was performed on the experimental data. The raw data along with the results of the regression analysis (method of least squares) are shown in Tables 2 and 3, respectively. Regression equations for ME_1 and ME_2 were $y = 0.0395x - 0.0034$ and $y = 0.0355x + 0.015$, respectively. The variance of the response variable, $S^2_{y,x}$ for the method ME_1 was calculated to be 3.9×10^{-5} and for ME_2 was 2.6×10^{-4} . These low values indicate the closeness of the experimental points to the least squares line. The fact is in concurrence with the low values of the standard error of mean absorbances of the solutions used for preparing the calibration curve. The variances of the slope S_b^2 , were calculated as 2.56×10^{-7} for ME_1 and 1.696×10^{-7} for ME_2 . The slope of the regressed line of ME_1 (0.0395) and ME_2 (0.0355) indicates that both the methods are equally sensitive and Beer's law is obeyed between 5 -50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for both ME_1 and ME_2 . The absorptivity of ME_1 and ME_2 are $9683 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and $8829 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectively and

el intervalo de concentración comprendido entre 5 y 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Los valores de absorptividad obtenidos fueron de 9683 $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ y 8829 $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ para M_1 y M_2 , respectivamente, y el valor del coeficiente de sensibilidad de Sandell de M_1 ($2,5 \times 10^{-5} \mu\text{g cm}^{-2}$ por 0,001 unidades abs) comparado con el de M_2 ($2,75 \times 10^{-5} \mu\text{g cm}^{-2}$ por 0,001 unidades abs) confirmó la observación. La varianza de la ordenada en el origen de la recta de regresión S_a^2 fue de $2,36 \times 10^{-4}$ para M_1 y $1,56 \times 10^{-4}$ para M_2 . Los valores de la ordenada en el origen de la recta de regresión se sometieron a la prueba 't' para determinar si eran significativamente distintos de cero. Los valores de 't' obtenidos fueron de 0,6998 para M_1 (cuatro grados de libertad) y de 0,48 para M_2 (cuatro grados de libertad) y los valores tabulados de t correspondientes fueron de 4,60 a cuatro grados de libertad con un nivel del 1%. La aceptación de la hipótesis de nulidad indica, por tanto, que estos valores no eran significativamente distintos de cero. En consecuencia, se puede afirmar que no existen interferencias de los disolventes utilizados en los distintos métodos, es decir, agua destilada y metanol.

Para comprobar la estabilidad de la citarabina en agua destilada y metanol, se analizó la solución de fármaco después de diversos intervalos de tiempo (0,5, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas) mediante los dos métodos espectrofotométricos desarrollados, tal como se muestra en las tablas 4 y 5 correspondientes a los métodos M_1 y M_2 , respectivamente. Los análisis de varianza de los valores de absorbancia media de las soluciones de diferentes concentraciones a intervalos de tiempo previamente establecidos indicaron la inexistencia de una diferencia significativa entre las lecturas ($F = 2,06$ y $0,975$ para M_1 y M_2 , respectivamente). La citarabina es, por tanto, estable durante un período de 24 horas tanto en agua destilada como en metanol. También se comprobó la estabilidad de la solución de fármaco por el método HPLC (Tabla 6) y los resultados obtenidos confirmaron la alta estabilidad de la solución de fármaco durante un período de 24 horas a temperatura ambiente. La estabilidad de la citarabina en solución puede ser útil para almacenar las muestras y poder analizarlas en un período de 24 horas.

the value of Sandell's sensitivity coefficient for ME_1 ($2.5 \times 10^{-5} \mu\text{g cm}^{-2}$ per 0.001 abs unit) as compared to ME_2 ($2.75 \times 10^{-5} \mu\text{g cm}^{-2}$ per 0.001 abs unit) also supports the observation. The variances of the intercept, S_a^2 , determined were 2.36×10^{-4} for ME_1 and 1.56×10^{-4} for ME_2 . To examine whether these intercepts were significantly different from zero, the intercepts were subjected to 't' test. The values of 't' were obtained as 0.6998 for ME_1 (four degrees of freedom) and 0.48 for ME_2 (four degrees of freedom) the corresponding tabulated values of t were 4.60 at four degree of freedom at the 1 % level. Thus acceptance of the null hypothesis indicates that these intercepts were not significantly different from zero. Therefore, there are no interferences from the solvents used in the methods, i.e. distilled water and methanol.

The stability of cytarabine in distilled water and methanol was monitored by analysing the drug solution after various time intervals (0.5, 1, 2, 4, 8, 12 and 24 h) by the two developed spectrophotometric methods as shown in Tables 4 and 5 for ME_1 and ME_2 , respectively. ANOVA studies of the mean absorbance values of the solutions of different concentrations at preselected time intervals indicated that no significant difference existed between the readings ($F = 2.06$ and 0.975 for ME_1 and ME_2 , respectively). Thus cytarabine is stable over a period of 24 h in both distilled water and methanol. The stability of the drug solution was also confirmed by the HPLC method (Table 6), which showed the drug solution is highly stable over a period of 24 h at room temperature. The stability of the cytarabine drug in solution form can be useful for storing the samples, so that analysis can be performed within a period of 24h.

TABLA 3. Valores de absorbancia media, valores de regresión y datos estadísticos de la curva de calibración para la estimación de la citarabina en metanol (M₂).**TABLE 3.** Mean absorbance values, regressed values and statistical data of the calibration curve for the estimation of cytarabine in methanol (ME₂).

Concentración Concentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Absorbancia media* (\pm E.E.) Mean Absorbance* (\pm S.E.)	Valor de regresión** Regressed Value**
5	0,202 \pm 0,0110	0,193
10	0,356 \pm 0,0110	0,371
20	0,724 \pm 0,0093	0,726
30	1,086 \pm 0,0100	1,081
40	1,454 \pm 0,0100	1,437
50	1,779 \pm 0,0076	1,792

Ecuación de regresión⁺⁺
 Ordenada en el origen (a) = $1,5 \times 10^{-2}$;
 Pendiente (b) = $3,55 \times 10^{-2}$;
 Coeficiente de correlación = 0,9998;
 n = 36.

*media de seis valores

**utilizando la ecuación de regresión

Regression equation⁺⁺
 Intercept (a) = 1.5×10^{-2} ;
 Slope (b) = 3.55×10^{-2} ;
 Correlation coefficient = 0.9998;
 n = 36.

*mean of six values

**using regression equation

TABLA 4. Estudio de estabilidad de la citarabina en agua destilada (M₁).**TABLE 4.** Stability study of cytarabine in distilled water (ME₁).

Concentración Concentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Absorbancia media* Mean Absorbance*						
	0,5 h	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h
5	0,189	0,192	0,188	0,194	0,189	0,186	0,188
10	0,379	0,375	0,384	0,385	0,378	0,38	0,376
20	0,813	0,811	0,815	0,818	0,810	0,811	0,813
30	1,191	1,190	1,186	1,192	1,196	1,187	1,191
40	1,553	1,559	1,554	1,552	1,556	1,55	1,548
50	1,978	1,982	1,980	1,982	1,973	1,976	1,979

*media de seis valores

*mean of six values

TABLA 5. Estudio de estabilidad de la citarabina en metanol (M₂).**TABLE 5.** Stability study of cytarabine in methanol (ME₂).

Concentración Concentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Absorbancia media* Mean Absorbance*						
	0,5 h	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h
5	0,202	0,196	0,204	0,201	0,203	0,198	0,195
10	0,356	0,359	0,352	0,355	0,36	0,351	0,355
20	0,724	0,729	0,728	0,722	0,725	0,721	0,722
30	1,086	1,084	1,088	1,088	1,08	1,086	1,089
40	1,454	1,450	1,451	1,459	1,457	1,453	1,457
50	1,779	1,773	1,782	1,781	1,776	1,774	1,784

*media de seis valores

*mean of six values

TABLA 6. Estudio de estabilidad de la solución de citarabina mediante el método HPLC.**TABLE 6.** Stability study of cytarabine solution by HPLC method.

Cantidad añadida Amount added (mg)	Cantidad detectada (mg) * Amount found (mg) *						
	0,5 h	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h
100	99,8	101,2	101,9	100,6	102,4	100,4	100,1

* media de seis valores

*mean of six values

Se realizó una estimación de la citarabina pura y de su formulación inyectable mediante ambos métodos. El agente amortiguador y el conservante presentes en la formulación inyectable no interfirieron en los análisis realizados por ambos métodos a las longitudes de onda respectivas. La cantidad de conservante (alcohol bencílico) utilizado en la formulación inyectable fue del 0,5%. Cuando se diluyó la formulación inyectable con una concentración de unos 5-50 $\mu\text{g/ml}$ de citarabina en metanol o agua destilada, la absorbancia del alcohol bencílico no provocó una interferencia significativa a las longitudes de onda analíticas (0,011 y 0,009 para M_1 y M_2 , respectivamente, con una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$). No fue necesario, por tanto, extraer el fármaco de la formulación. Antes del análisis se realizó la dilución adecuada. El resumen de resultados de la Tabla 7 muestra que no existe una diferencia significativa entre la cantidad añadida y la cantidad detectada mediante ambos métodos y en la formulación inyectable, siendo la cantidad de citarabina detectada por ambos métodos muy próxima a la indicada en la etiqueta.

Estimation of cytarabine was carried out, using both the methods, for pure drug and also for the injection formulation. The buffering agent and the preservative present in the injection formulation did not interfere in the analysis at the respective wavelengths of the two methods. The amount of preservative (benzyl alcohol) used in the injection formulation was 0.5 %. When the injection was diluted to around 5-50 $\mu\text{g/ml}$ of cytarabine in methanol or distilled water, the absorbance of benzyl alcohol was not significant to interfere at the analytical wavelengths (0.011 and 0.009 for ME_1 and ME_2 , respectively at a concentration of 5 $\mu\text{g/ml}$). So there was no need to extract the drug from the formulation. Appropriate dilution was made before analysis. The results are summarized in Table 7 and show that there is no significant difference between the amount added and the amount found by both methods and in the injection formulation, the amount found by both the methods is very close to the labelled amount of cytarabine.

TABLA 7. Evaluación de la exactitud y precisión de los métodos propuestos.

TABLE 7. Evaluation of accuracy and precision of the proposed methods.

Cantidad exacta de fármaco añadida Exact amount of drug added (mg)		Cantidades individuales detectadas (mg); media (D.E.) ^a Individual amounts found (mg); mean (S.D.) ^a		Coeficiente de variación Coefficient of variation (CV)		Error relativo medio (ERM) Relative mean error (RME)		Límites de confianza ^b Confidence limits ^b	
M ₁	M ₂	M ₁	M ₂	M ₁	M ₂	M ₁	M ₂	M ₁	M ₂
(A) Fármaco puro / (A) Pure drug									
25,2	24,7	24,9	24,6	0,0061	0,0128	0,0026	0,0039	25,07 ± 0,38	24,97 ± 1,27
24,9	25,1	25,1	25,2						
25,3	25,4	25,2	25,1						
		25,07 (0,153)	24,97 (0,321)						
50,4	50,3	50,1	50,4	0,0053	0,0095	0,0022	0,0033	49,8 ± 0,66	49,87 ± 1,58
50,1	49,7	49,7	49,5						
49,6	50,1	49,6	49,7						
		49,8 (0,265)	49,87 (0,473)						
100,3	100,1	100,2	100,2	0,0038	0,0044	0,001	0,0023	99,93 ± 0,94	99,9 ± 1,08
99,8	99,9	100,1	99,4						
99,6	100,4	99,5	100,1						
		99,93 (0,379)	99,9 (0,436)						
(B) Formulación comercial (inyección de citarabina) / (B) Marketed formulation (Cytarabine injection)									
100	100	104,3	105,7	0,0078	0,0087	0,0045	0,0047	104,5 ± 2,03	104,73 ± 2,25
100	100	103,8	104,6						
100	100	105,4	103,9						
		104,5 (0,819)	104,73 (0,907)						

^an = 3.

^bLímites de confianza con P = 0,95 y dos grados de libertad.

Para determinar la precisión y exactitud de los métodos, se sometieron cantidades conocidas de fármaco puro a estudios de recuperación mediante ambos métodos por triplicado. En la Tabla 7 se muestra un resumen de los resultados de estas investigaciones. Se evaluó la exactitud de cada método mediante la prueba 't' con cada nivel. Los valores 't' calculados con 25, 50 y 100 mg fueron 0,459, 1,94 y 0,25, respectivamente, para el método M₁, y 0,50, 0,64 y 1,32 para el método M₂. Estos valores son inferiores al valor 't' tabulado de 4,30 (P ≤ 0,05), lo que indica la inexistencia de una diferencia significativa entre la cantidad añadida y la cantidad estimada. Para comparar la exactitud de ambos métodos se calculó el error medio relativo de cada método, que se muestra en la Tabla 7. El error medio relativo de M₁ es menor que el de M₂ con cada nivel, lo que significa que la exactitud del método M₁ es mayor que la del método M₂.

Para evaluar la precisión de ambos métodos se utilizó la desviación estándar de los resultados, el coeficiente de variación y la prueba F. Los valores F calculados para 25, 50, 100 mg y citarabina inyectable fueron 4,40,

In order to determine the precision and accuracy of the methods, known amounts of pure drug were subjected to recovery studies, using both the methods, in triplicate. Table 7 summarizes the results of these investigations. Accuracy of each method was ascertained using the 't' test at each level. The computed 't' values of 25, 50 and 100 mg for ME₁ were 0.459, 1.94 and 0.25, respectively, and for ME₂ were 0.50, 0.64 and 1.32, respectively. These values are lower than the tabulated 't' value of 4.30 (P ≤ 0.05) indicating no significant difference between the added and the estimated quantity. To compare the accuracy of both the methods the relative mean error of each method was calculated and is shown in Table 7. The relative mean error for ME₁ is less than that for ME₂ at each level signifying that ME₁ is more accurate than ME₂.

The precision of both the methods was evaluated using the S.D. of the results, the coefficient of variation and the F-test. The computed F-values for 25, 50, 100 mg and cytarabine injection were 4.40, 3.19, 1.32 and 1.23, respectively which were found to be not significant at P ≤ 0.05 as compared to the tabulated F-value of 5.05. This indicates that there is no

3,19, 1,32 y 1,23, respectivamente, valores no significativamente diferentes del valor F tabulado de 5,05 a $P \leq 0,05$. Estos resultados indican que no existe una diferencia significativa en la precisión de ambos métodos. Se comparó la precisión de los dos métodos con la del método de cromatografía de líquidos⁶ para la estimación de la citarabina de la formulación inyectable. Los valores F obtenidos para los métodos M_1 y M_2 comparados con el método de cromatografía de líquidos fueron de 1,02 y 1,25, respectivamente e inferiores, por tanto, al valor F tabulado de 5,05 a $P \leq 0,05$, lo que demuestra que no existe una diferencia significativa de precisión entre los métodos comparados.

En la tabla 8 se muestran los resultados de la determinación de la citarabina de la formulación inyectable mediante el método de cromatografía de líquidos. La cantidad de citarabina indicada en la etiqueta de la formulación inyectable era de 100 mg. La cantidad de citarabina detectada en la formulación inyectable (alrededor de un 104,5%) se encontraba dentro del intervalo aceptable determinado por la farmacopea de Estados Unidos (no inferior al 90% y no superior al 110% de la cantidad indicada en la etiqueta). Los resultados obtenidos mediante los métodos espectrofotométricos desarrollados fueron similares a los del método HPLC. Para realizar la comparación entre los métodos espectrofotométricos y el método HPLC se utilizó la prueba de t-Student con un nivel significación de $P < 0,05$. La diferencia obtenida entre ambos métodos no fue estadísticamente significativa.

significant difference between the precisions of both the methods. The precision of both the methods was compared with that of the reported liquid chromatographic method⁶ for the estimation of cytarabine from cytarabine injection. The F-values for the methods ME_1 and ME_2 when compared with liquid chromatographic method are 1.02 and 1.25, respectively, which is less than the tabulated F-value of 5.05 at $P \leq 0.05$, and this shows that there is no significant difference in the precision between the methods compared.

The results of the determination of cytarabine from cytarabine injection by liquid chromatographic method are given in Table 8. The labeled amount of cytarabine was 100 mg in the cytarabine injection. The amount of cytarabine found in cytarabine injection (about 104.5 %) was within the acceptable range as per the United States Pharmacopoeia (not less than 90.0 % and not more than 110.0 % of the labelled amount of cytarabine). The results obtained from the developed spectrophotometric methods were similar to that of the reported HPLC method. The comparison between the spectrophotometric methods and the HPLC method was done using unpaired Student 't' test at the significance level of $P < 0.05$. The difference between the methods was found to be statistically nonsignificant.

TABLA 8. Resultados de la estimación de citarabina en la formulación inyectable mediante el método de cromatografía de líquidos de alto rendimiento.

TABLE 8. Results of estimation of cytarabine in cytarabine injection by high performance liquid chromatographic method.

Cantidad de la etiqueta <i>Labelled amount (mg)</i>	Cantidad detectada (mg); media (D.E.) * <i>Amount found (mg) mean (S.D.) *</i>	Coefficiente de variación <i>Coefficient of variation (CV)</i>	Error relativo medio (ERM) <i>Relative mean error (RME)</i>	Límites de confianza** <i>Confidence limits**</i>
100	105,44	0,00778	0,0429	104,29 ± 0,85
	104,70			
	104,29			
	103,36			
	103,37			
	104,60			
	104,29 (0,812)			

*n=6

**límites de confianza con P = 0,95 y 5 grados de libertad

*n=6

**confidence limits at P = 0.95 and 5 degrees of freedom

Los métodos espectrofotométricos desarrollados fueron realizados en diferentes laboratorios (L_1 , L_2 y L_3) por distintos analistas (A_1 , A_2 y A_3) para estudiar su reproducibilidad. Los resultados se muestran en la Tabla 9. Se realizó la prueba ANOVA de una dirección para comprobar la existencia de diferencias significativas entre ellos. Los resultados de la prueba ANOVA mostraron que no existía ninguna diferencia significativa entre los valores obtenidos en los diferentes laboratorios mediante ambos métodos (los valores F obtenidos con M_1 y M_2 fueron de 1,05 y 3,096, respectivamente, con un valor F crítico de 5,14 para ambos métodos). Los datos obtenidos en los diferentes laboratorios fueron muy similares, lo que demuestra la reproducibilidad de ambos métodos.

The developed spectrophotometric methods were carried out in different laboratories (L_1 , L_2 and L_3) by different analysts (A_1 , A_2 and A_3) for studying its reproducibility. The results are given in Table 9. One-way ANOVA was performed to find out any significant difference between them. The results of the ANOVA showed that there was no significant difference between the values obtained from different laboratories for both the methods (F values for ME_1 and ME_2 are 1.05 and 3.096, respectively, whereas F-critical value is 5.14 for both the methods). The data obtained from one laboratory were well in agreement with the data obtained from the other laboratory which proves the reproducibility of both the methods.

TABLA 9. Evaluación de la reproducibilidad de los métodos propuestos M_1 y M_2 .**TABLE 9.** Evaluation of the reproducibility of the proposed methods ME_1 and ME_2 .

	M_1 ME_1			M_2 ME_2		
	L_1 (μg)	L_2 (μg)	L_3 (μg)	L_1 (μg)	L_2 (μg)	L_3 (μg)
A_1	9,93 (0,019)	10,2 (0,035)	10,1 (0,024)	9,90 (0,036)	10,34 (0,024)	10,26 (0,018)
A_2	10,2 (0,037)	10,03 (0,027)	9,98 (0,016)	9,67 (0,016)	9,90 (0,06)	9,97 (0,007)
A_3	9,89 (0,046)	10,21 (0,019)	10,09 (0,021)	9,86 (0,019)	10,11 (0,026)	10,06 (0,019)

CONCLUSIONES

La estimación de la citarabina se puede realizar mediante el método M_1 (agua destilada) y el método M_2 (metanol) a 272 y 274 nm, respectivamente. Ambos métodos tiene la ventaja de su simplicidad, reproducibilidad y exactitud. La no interferencia de los excipientes parenterales hace que estos métodos sean adecuados para la estimación del fármaco inyectable y, por lo tanto, para la realización de los controles de calidad rutinarios de las formulaciones de citarabina. Los resultados del estudio anterior indican la idoneidad de estos métodos para la estimación tanto de la citarabina pura como de su formulación inyectable. Los métodos desarrollados son comparables al método oficial elaborado en la farmacopea de Estados Unidos. Estos métodos se pueden seleccionar también como métodos alternativos a otros procedimientos existentes más largos y costosos como la cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) y las volumetrías potenciométricas no acuosas.

RECONOCIMIENTOS

Los autores manifiestan su agradecimiento al Consejo de Investigación Científica e Industrial (Council of Scientific and Industrial Research, CSIR) de Nueva Delhi por la financiación de este proyecto.

CONCLUSIONS

Cytarabine can be estimated using both the methods ME_1 (distilled water) and ME_2 (methanol) at 272 and 274 nm, respectively. Both the methods have the advantages of simplicity, reproducibility and accuracy. The non-interference of the parenteral excipients makes the methods suitable for the estimation of the drug in injection and hence can be used for the routine quality control of cytarabine formulations. The results of the above study indicated the suitability of the methods to estimate cytarabine in bulk as well as in injectable formulation. The developed methods are comparable to the official method elaborated in the United States Pharmacopoeia. These methods may also be selected as alternative methods to the existing time consuming and expensive methods like HPLC and non-aqueous potentiometric titrations.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi for providing financial support to the project.

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Handman JG, Goodman A. Antineoplastic agents. in: The Pharmacological Basis of Therapeutics. Chabner BA, Allegra CJ, Lurt GA, Calabresi P (eds.), 9th edition, McGraw-Hill, New York, 1996; 1251-1252.

2. Larson RA. Management of myelodysplastic syndromes. *Ann. Intern. Med.* 1985; 103: 136-138.
3. Tricot G, Boogaerts MA. The role of aggressive chemotherapy in the treatment of the myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* 1986; 63: 477-483.
4. Tricot G, Bock RD, Dekker AW. Low dose cytosine arabinoside (Ara C) in myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* 1984; 58: 231-240.
5. Roberts JD, Ershlew WB, Tindle BH. Low-dose cytosine arabinoside in the treatment of myelodysplastic syndromes and acute myelogenous leukemia. *Cancer* 1985; 56: 1001-1005.
6. United States Pharmacopoeia 25 / National Formulary 20, United States Pharmacopoeial Convention, Inc, Rockville, 2002; 499-500.
7. British Pharmacopoeia, Department of Health and Social Security, Welsh office, Ministry of Health and Social Services of Northern Ireland, 2000; 487- 488.
8. The Indian Pharmacopoeia, fourth ed., Controller of Publications, New Delhi, 1996; 1: 220-221.
9. European Pharmacopoeia, third ed., Council of Europe, Strasbourg, 1997; 704.
10. Chen XN, Zhang CX, Lu JR. Application of flow injection technique in pharmaceutical analysis. Part I.: Spectrophotometric and chemiluminescence detection. *Fenxi Shiyanshi* 2000; 19: 62.
11. Armstrong NA, James KC. *Pharmaceutical experimental design and interpretation*; Taylor and Francis Publishers, Bristol PA, USA, 1996; 29 -37.
12. Bolton S, Swarbrick J. (ed.) *Linear regression and correlation in pharmaceutical statistics: Practical and clinical applications*, third ed., Marcel Dekker, New York, 1990; 216- 264.