

## Desarrollo de un método y su validación para la determinación de melatonina en tabletas

María del Socorro Ramírez Gutiérrez\*

Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP

Mirta Castineira

IFAL. Universidad de la Habana

San Lázaro y L Vedado, Ciudad de la Habana

Olga María Nieto

IFAL. Universidad de la Habana

San Lázaro y L Vedado, Ciudad de la Habana

(Recibido: 30 de abril de 2009; Aceptado: 17 de julio de 2009)

Se desarrolló y validó un método para la cuantificación de melatonina en materia prima y en forma farmacéutica tabletas por espectrofotometría ultravioleta. Se utilizaron soluciones patrones de melatonina y se evaluaron los siguientes parámetros: linealidad, precisión, robustez, exactitud y especificidad del método. Se obtuvieron resultados que mostraron que este método presenta linealidad entre 27 y 33  $\mu\text{g/mL}$ , presenta buena precisión, robustez en cuanto a las variaciones en la temperatura así como del pH y exactitud. La especificidad del método en tabletas no se vio comprometida con la presencia de excipientes

*Palabras clave:* Melatonina; Espectrofotometría ultravioleta

An analytical method was developed and validated for the quantification of melatonin in tablets by spectrophotometry, with ultraviolet. The parameters of specificity, linearity, exactness and precision were evaluated. The calibration curve was performed in the range from 27 to 33  $\mu\text{g/mL}$  which was lineal. The results attained by parameters analyzed in the validation of the method were within the established limits. Neither excipients present in the formulation, interfere with the assay. The applied analytical method proved to be lineal, precise, specific and exact in the range of the studied concentrations.

*Keywords:* Melatonin; Ultraviolet spectrophotometry

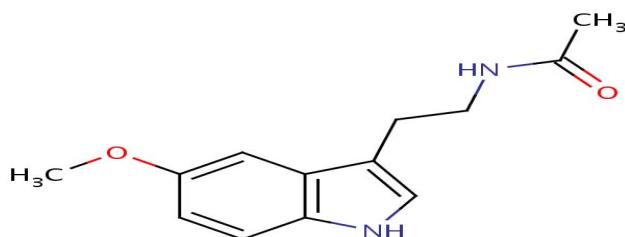
### 1. Introducción

La melatonina (ME) es una hormona que es sintetizada en la glándula pineal a partir del triptófano [1], y que interviene en la regulación de los ritmos circadianos [2]. Su secreción nocturna está ligada a los ciclos de luz oscuridad que se producen en el medio exterior, desempeñando un importante papel en la regulación biológica de los ritmos circadianos, sueño, y comportamiento; así como, posiblemente, en la reproducción, crecimiento tumoral y envejecimiento [3].

Hace unos años se puso de moda su empleo en donde está comercializada como suplemento dietético, utilizándose como automedicación en el tratamiento de una gran variedad de enfermedades: trastornos del sueño, "jet lag" (desfase horario en viajes aéreos de larga duración), horario laboral inusual, ceguera con motivo de trastornos del sueño [4]. En la población normal los niveles de melatonina endógena están más elevados durante las horas normales de sueño, aumentando de forma rápida al final de la tarde, alcanzándose el nivel máximo después de

medianoche y disminuyendo por la mañana [5,6]. Recientemente se ha observado que la deficiencia de melatonina puede tener un importante papel en la elevada incidencia de insomnio existente entre los ancianos [6,9] que presentan concentraciones séricas de melatonina más bajas y concentraciones plasmáticas máximas nocturnas más tardías. En estos pacientes con insomnio la terapia sustitutiva con melatonina de liberación controlada puede mejorar la calidad del sueño. En algunos ensayos clínicos realizados en pacientes de diversas edades (ancianos, adultos, jóvenes) se ha visto que la administración de melatonina acelera la inducción al sueño, mejorando la duración y calidad de éste [2, 4, 6,7].

La melatonina exógena ha sido autorizada y designada como producto huérfano por la FDA únicamente para el tratamiento de los trastornos del sueño del ritmo circadiano en pacientes ciegos sin ninguna percepción de luz [7,8]. En México la Secretaría de Salud ha autorizado su comercialización como inductor de sueño después de haber sido evaluada científicamente y obtener su registro por varias industrias mexicanas. Su control de calidad como

**Figura 1.** Melatonina

medicamento requiere de métodos analíticos validados para su análisis [9].

La melatonina presenta una fórmula condensada C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con un peso molecular de 232.28, presenta una viabilidad del 30 al 50 % y su tiempo de eliminación es de 32 a 40 minutos y su excreción es por vía renal [10]. Su estructura molecular es la N-acetyl-5-methoxytryptamina (figura 1).

La validación analítica de los métodos de análisis es uno de los elementos básicos en sistemas de calidad. La validación trata de disminuir o controlar los factores que llevan a la imprecisión o inexactitud de un dato generado, a través de la realización de un trabajo analítico dentro de unos parámetros definidos generando una mayor fiabilidad y aceptación de los datos generados, al estar estas en proporción con la calidad del proceso de obtención de los mismos [11]. Teniendo en cuenta la introducción de la melatonina como medicamento en tabletas y el no disponer de un método de referencia de la melatonina descrito en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) se hace necesario disponer de métodos validados confiables de cuantificación de esta sustancia. La cuantificación de la melatonina por espectrofotometría ultravioleta es posible debido a la presencia de dobles enlaces alternados y pares de electrones no covalentes en su estructura. Por lo que este trabajo tiene como objetivo el desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de la melatonina por espectrofotometría ultravioleta.

**Tabla 1.** Resultados de linealidad del método.

	Resultados	Criterion
Coeficiente de variación (cv)	0.80	2.0%
Ordenada al origen(b)	-0.1093	Aprox. =0
Pendiente (m)	1.0040	Aprox. =1
Coeficiente de determinación ( $r^2$ )	0.9905	0.98

## 2. Material y métodos

### 2.1. Medidas espectrofotométricas. Determinación del máximo de absorción

La absorbancia de soluciones acuosas conteniendo melatonina (Sigma Aldrich Chem.Co.) 30  $\mu$ g/mL fue determinada en un espectrofotómetro marca Spectronic 21 entre 200 a 400 nm, en intervalos de 1nm, con agua como referencia.

### 2.2. Linealidad e intervalo

Fueron preparadas por triplicado soluciones conteniendo 27, 30, 33  $\mu$ g/mL de melatonina. La absorbancia fue determinada por triplicado en la longitud de onda de 307nm, totalizando nueve lecturas para cada muestra. La curva de calibración conseguida a partir de estas medidas fue analizada por un método de regresión lineal, calculándose el coeficiente de correlación en la ecuación de la recta.

### 2.3. Evaluación de la precisión

En el estudio de la precisión, para la repetibilidad, en ambos casos, se ensayaron 6 muestras, correspondientes al 100% de la concentración. Para el análisis de la precisión intermedia se estudiaron 3 muestras por 2 analistas 2 días diferentes.

### 2.4. Evaluación de robustez

La robustez del método se evaluó considerando la influencia del pH y de la temperatura. Para la evaluación de la influencia del pH se prepararon soluciones de melatonina 30  $\mu$ g/mL con soluciones tampón de diferentes valores de pH (3-5). La lectura de la absorbancia se realizó a una longitud de onda de 307 nm, a 20°C, inmediatamente después de la preparación de las muestras (n = 6).

La influencia de la temperatura se determinó realizando la lectura de la absorbancia de nuevas soluciones de melatonina 30  $\mu$ g/mL, inmediatamente después de la preparación de las muestras, a temperaturas de 50°C a 4°C (n = 6).

### 2.5. Determinación de exactitud

La exactitud se verificó por medio de la prueba de la recuperación [12]. Se incorporaron cantidades conocidas de melatonina patrón a un vehículo; (n=3) obteniéndose muestras conteniendo 90%, 100% y 110% de principio activo. Cantidades apropiadas de las muestras se disolvieron con 15 mL de etanol y luego se diluyeron con agua hasta un volumen final de 100 mL y las soluciones resultantes se filtraron en papel de filtro cualitativo Watman no. 41. Las soluciones filtradas se diluyeron, con el fin de obtenerse soluciones con concentraciones de 27,

Tabla 2. Relación de la cantidad adicionada y la propiedad medida.

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F
Regresión	1	5331.18	5331.188	804.55
Error de regresión	7	51.125	6.62625	
Falta de Ajuste	1	21.0937	21.0937	4.214
Error puro	6	30.0312	5.0052	

30, 33  $\mu\text{g/mL}$  de melatonina, se calculó el porcentaje de recuperación del método. Se utilizó agua como referencia y solución de melatonina estándar 30  $\mu\text{g/mL}$  como control.

### 2.6. Determinación de la especificidad

La especificidad del método se determinó, analizando el placebo contra la tableta de melatonina a la longitud de onda determinada.

## 3. Resultados y discusión

El método de determinación de melatonina por espectrofotometría ultravioleta se realizó en la longitud de onda en que ocurre la absorción máxima del fármaco. El espectro de absorción de la melatonina mostró un máximo de absorción en la longitud de onda de 307 nm.

### 3.1. Linealidad

La curva de calibración (tabla 1) se obtuvo por la absorbancia de diferentes concentraciones de melatonina, en el intervalo de 27 a 33  $\mu\text{g/mL}$  (90 – 110 %) el método es lineal y presenta un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) igual a 0,9905. La linealidad determina la región de la curva respuesta o de cuantificación en que hay relación directa entre la señal instrumental y la concentración del producto analizado [11], siendo un método lineal cuando presenta una  $r^2 > 0,98$ .

Si  $F_r (804.5558) > F (gl, r, gl, er; 0.99) 9.07$ : Existe una

relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida.

### 3.2. Robustez

Al evaluarse la robustez del método, esto es, la capacidad del resultado de no sufrir alteraciones por pequeñas modificaciones en los parámetros de análisis, se comprobó que las variaciones de temperatura (de 50°C a 4°C) no interfieren en los resultados obtenidos, manteniéndose constantes los valores absorbancia en 307nm. Cambios en los valores de pH (3-5) del medio, no interfirió en el análisis cuantitativo de melatonina.

La diferencia entre el promedio de las condiciones normales y las modificadas no debe ser mayor a +/- 3 %. Se considera que el método analítico propuesto es robusto a la modificación del pH y temperatura, puesto que no hay alteraciones significativas en los resultados obtenidos, como se muestra en la tabla 3.

### 3.3. Exactitud

Los valores referentes a la exactitud del método, obtenidos por medio de la prueba de recuperación, se encuentran en la tabla 4. El porcentaje de melatonina recuperado muestra que el método presenta exactitud, o sea, que los valores obtenidos en la determinación están próximos al valor verdadero. Porcentajes de recuperación entre 97% y 103% son considerados aceptables.

Tabla 3. Influencia del pH y temperatura en la absorbancia

Muestra/condición	M1	M2	M3
Análisis inicial	100.02	100.22	100.27
pH 3	100.89	101.23	100.72
Desviación entre las condiciones iniciales y las ensayadas	0.87	1.01	0.65
pH 5	99.00	98.82	98.48
Desviación entre las condiciones iniciales y las ensayadas	-1.02	-1.40	-1.59
4°C	100.75	100.40	100.09
50°C	101.95	101.90	102.10
Desviaciones entre las condiciones iniciales y las ensayadas	1.73	1.18	2.02

**Tabla 4. Exactitud del método por ensayo de recuperación.**

	<b>Resultados</b>	<b>Criterio</b>
Promedio de recobro (100%)	100.81%	97-103%
Desviación estándar (100%)	0.47	2.0%
Repetibilidad del método	*/-0.92	2.0%

### 3.4. Precisión

Los resultados de las pruebas de precisión intermedia muestran las variaciones obtenidas en las absorbancias, la absorbancia media y la desviación estándar relativa, obtenida interdías (tabla 5). La repetibilidad en los valores de absorbancia de los análisis interdías con bajos valores de CV indican que el método es preciso. Los valores de CV por debajo de 2% en análisis de repetibilidad (interdía/analista) y por debajo de 2% en análisis de precisión intermedia (analistas) son considerados aceptables.

En la repetibilidad el CV obtenido de 6 análisis realizado a seis muestras a la misma concentración fue de 1.2641 para interanalista y de 1.5663 para interdía/analista.

Si  $F_a$  (8.3448) <  $F$  (gl a, gl d; 0.05)

(18.5): El método analítico es reproducible por los analistas  
Si  $F_d$  (0.5321) <  $F$  (gl d, gl e; 0.05) (4.46): El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

El analista no presenta efecto sobre la valoración, no existe efecto de los días para un analista en la validación.

### 3.5. Especificidad

Al realizar el análisis a un placebo y a una muestra de tabletas de melatonina a la concentración de 30 $\mu$ g/mL. no se observó absorbancia ninguna del placebo por lo que podemos afirmar que el método es específico para determinar la melatonina en presencia de las sustancias auxiliares.

**Tabla 5. Precisión intermedia**

<b>CV Total</b>
Precisión intermedia interanalista 1.2641
Precisión intermedia interdía/analista 1.5663

Criterio: coeficiente de variación menor al 2%.

**Tabla 6. Precisión intermedia.**

<b>Fuente de variación</b>	<b>gl</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Media de cuadrados</b>	<b>F</b>
Analista	1	2.8359	2.8359	8.344
Día	2	0.1093	0.3398	0.53210
Error	8	5.1093	0.6396	

## 4. Conclusiones

Actualmente, no existe un método validado de cuantificación descrito en farmacopeas que permita realizar el control de Calidad de las tabletas de melatonina. Con tal motivo fue desarrollado un método de análisis cuantitativo para la melatonina por espectrofotometría al UV a su máximo de absorción (307 nm), el cual resulta sencillo y rápido.

La técnica propuesta demuestra ser lineal, precisa, robusta, y exacta para la cuantificación de melatonina en materia prima y en producto terminado tabletas. No existe interferencia con las sustancias auxiliares presentes de la tableta por lo tanto es específico

## Referencias

- [1]. Melatonin (Drug Evaluation). In: Gelman CR et al, editors. Drugdex® Information System. **93**. Englewood: Micromedex Inc, 1997.
- [2]. A, Brzezinski. Melatonin in humans. *N Engl J Med*; **336**, 186 (1997)
- [3]. A, Li Wan Po A. OTC Medications. Symptoms and Treatments of Common Illnesses, 2nd ed. Oxford: Blackwell Science, 203. (1997)
- [4]. Melatonin – Prevention of jet lag (Drug Consults). In: Gelman CR et al, editors. Drugdex®. Information System. Vol. 93. Englewood: Micromedex Inc, 1997.
- [5]. J, Arendt et al. Alleviation of jet lag by melatonin: preliminary results of controlled double blind trial. *Br Med J (Clin Res)*; **292**, 1170 (1986)
- [6]. K, Petrie et al. Effect of melatonin on jet lag after long haul flights. *BMJ*; **298**, 705 (1989)
- [7]. BJ, Holliman et al. Problems in assessment of acute melatonin overdose. *South Med J*; **90**, 451 (1997).
- [8]. D, Garfinkel et al. Improvement of sleep quality in elderly people by controlled-release melatonin. *Lancet*; **346**, 541 (1995).
- [9]. IV, Zhdanova et al. Sleep-inducing effects of low doses of melatonin ingested in the evening. *Clin Pharmacol Ther*; **57**, 552 (1995).
- [10]. PL, Canales et al. A Pharmacist's guide to transient insomnia. *J Am Pharm Assoc*; **36**, 421 (1996).
- [11]. ICH. Note for Guidance on Validation of Analytical Methods: Methodology. International Conference on Harmonization, 29 November 1995.
- [12]. The United States Pharmacopeia. *USP XXVI*. Rockville: United States Pharmacopeial Convention; 2003.