

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE
METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DE
FLUTICASONA POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA E
ELETROFORESE CAPILAR**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Maximiliano da Silva Sangoi

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
PARA AVALIAÇÃO DE FLUTICASONA POR
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA E ELETROFORESE CAPILAR**

por

Maximiliano da Silva Sangoi

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA
AVALIAÇÃO DE FLUTICASONA POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA
E ELETROFORESE CAPILAR**

elaborada por
Maximiliano da Silva Sangoi

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Sérgio Luiz Dalmora, Dr.
(Presidente/Orientador)

Anselmo Gomes de Oliveira, Dr. (UNESP)

Clarice Madalena Bueno Rolim, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 24 de março de 2009.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida, por me permitir chegar até aqui e tornar tudo possível.

Aos meus pais, Antonio Renato e Claudeti, à minha irmã, Renata, e ao meu irmão, Pablo Reno, pelo amor, educação, apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora, pelo apoio, amizade, confiança, orientação e revisão crítica.

À Micheli, pelo amor, carinho, atenção e compreensão, fundamentais para a conclusão de mais uma etapa.

Aos colegas, bolsistas e técnicos dos Laboratórios de Bioequivalência e Controle da Qualidade de Produtos Biológicos, pelo auxílio e amizade.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Farmácia Industrial.

À UFSM, que possibilitou a execução deste trabalho.

A todos que, mesmo não citados, contribuíram de alguma maneira para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DE FLUTICASONA POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA E ELETROFORESE CAPILAR

AUTOR: MAXIMILIANO DA SILVA SANGOI

ORIENTADOR: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 24 de março de 2009.

O propionato de fluticasona (PF) é um glicocorticóide sintético com potente atividade anti-inflamatória utilizado efetivamente no tratamento de rinites alérgicas sazonais e perenes, minimizando a atividade sistêmica. No presente trabalho foram desenvolvidos e validados métodos para avaliação de PF em produtos farmacêuticos. As análises por cromatografia líquida em fase reversa foram realizadas utilizando coluna Shim-pack CLC-ODS (150 x 4,6 mm), mantida à 35°C. A fase móvel foi composta de acetonitrila/ metanol/ tampão fosfato 0,01M pH 4 (35:35:30), eluída na vazão de 1 mL/min e detecção no ultravioleta a 240 nm. A separação cromatográfica foi obtida no tempo de 8 minutos, sendo linear na faixa de concentração de 0,05-150 µg/mL ($r^2 = 0,9999$). O método foi aplicado para análise de PF em cremes e sprays nasais. Paralelamente, desenvolveu-se e validou-se método por cromatografia eletrocínética micelar. Executaram-se as análises utilizando capilar de sílica (comprimento efetivo de 40 cm e diâmetro de 50 µm) e solução eletrolítica composta de borato 25 mM e SDS 25 mM, pH 9. O capilar foi mantido a temperatura de 35°C, e aplicada voltagem de 20 kV. O tempo de injeção foi de 6 s com pressão de 50 mbar e detecção no UV a 238 nm. Realizou-se a separação eletroforética com tempo de migração de 5,6 e 5,1 minutos para o PF e acetato de prednisolona (padrão interno), respectivamente, com tempo de corrida de 7 minutos. O método foi linear na faixa de 2-80 µg/mL ($r^2 = 0,9956$). Os procedimentos foram validados, avaliando-se os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e quantificação, cujos resultados cumpriram os requisitos preconizados. Os métodos propostos foram utilizados para análise de produtos farmacêuticos, demonstrando que não há diferenças significativas dos resultados ($P > 0,05$). Assim, os procedimentos pesquisados contribuem para aprimorar o controle da qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica das formulações farmacêuticas.

Palavras-chave: cromatografia líquida; eletroforese capilar; formulações farmacêuticas; propionato de fluticasona; validação.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODOLOGY FOR THE EVALUATION OF FLUTICASONE BY LIQUID CHROMATOGRAPHY AND CAPILLARY ELECTROPHORESIS

AUTHOR: MAXIMILIANO DA SILVA SANGOI

ADVISER: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Presentation date: Santa Maria, March 24th 2009.

Fluticasone propionate (FP) is a synthetic glucocorticoid with potent anti-inflammatory activity that has been effectively used for the treatment of seasonal and allergic perennial rhinitis, minimizing systemic activity. In the present study, the methods were developed and validated for assessment of FP in pharmaceutical products. The analysis by reversed-phase liquid chromatography were performed using Shim-pack CLC-ODS column (150 x 4.6 mm), maintained at 35 °C. The mobile phase was consisted of acetonitrile/ methanol/ 0.01M phosphate buffer pH 4 (35:35:30), run at flow rate of 1 mL/min and using photodiode array detection at 240 nm. The chromatographic separation was obtained within 8 minutes and it was linear in the concentration range of 0.05-150 µg/mL ($r^2 = 0,9999$). The method was successfully applied for the determination of FP in creams and nasal sprays pharmaceutical formulations. The micellar electrokinetic chromatography was also developed and validated. The analyses were performed on a fused-silica capillary (50 µm i.d.; effective length, 40 cm) and background electrolyte consisted of 25 mM borate and 25mM SDS solution at pH 9. The capillary temperature was maintained at 35 °C and the applied voltage was 20 kV. The injection was performed using the hydrodynamic mode at 50 mbar for 6 s, with detection at 238 nm. The electrophoretic separation was obtained with migration time of 5.6 and 5.1 minutes for the FP and prednisolone acetate (internal standard), respectively, and with run time of 7 minutes. The method was linear in the concentration range of 2-80 µg/mL ($r^2 = 0.9956$). The procedures were validated evaluating parameters such as the specificity, linearity, precision, accuracy, and robustness, limit of detection and limit of quantitation, whose results have met the requirements recommended. The proposed methods were used for the analysis of pharmaceutical products, demonstrating non-significative difference of the results ($P > 0.05$). Then, the procedures contribute to improve the quality control, assuring the safety and therapeutic efficacy of pharmaceutical formulations.

Keywords: capillary electrophoresis; fluticasone propionate; liquid chromatography; pharmaceutical formulations; validation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura química do propionato de fluticasona 17

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.1

FIGURE 1 – Chemical structure of fluticasone propionate (FP) 30

FIGURE 2 – LC chromatograms of FP (50 µg/mL). (a) FP reference substance solution: peak 1 = FP. (b) After acidic hydrolysis: peak 1 = FP. (c) After basic hydrolysis: peaks 1 = degraded form, 2 = FP. (d) After neutral condition: peak 1 = FP. (e) After oxidation: peaks 1 = hydrogen peroxide, 2 = FP. (f) After exposition to UV light: peaks 1 = FP, 2 = photodegraded form..... 37

FIGURE 3 – Representative RP-LC chromatograms of FP reference substance solution (a); FP nasal sprays formulations (b) and FP cream formulations (c). Peak 1 = FP (50 µg/mL) 40

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.2

FIGURE 1 – Chemical structure of fluticasone propionate (FP) 47

FIGURE 2 – Effect of BGE solution pH on migration time (■) and peak width (▲) of FP. Operating conditions: 25mM borate and 25mM SDS solution (pH 9), hydrodynamic injection (6 s at 50 mbar), 20 kV, 35 °C, and 238 nm. FP: 40 µg/mL 56

FIGURE 3 – Effect of SDS concentration on migration time (■) and theoretical plate number (▲) of FP..... 56

FIGURE 4 – Representative electropherogram of a reference substances solution containing (1) prednisolone acetate (IS) and (2) fluticasone propionate (FP) at a concentration of 40 µg/mL 57

FIGURE 5 – MEKC electropherograms of FP. After: (a) acidic hydrolysis; (b) neutral heated hydrolysis; (c) photodegraded condition; (d) oxidative condition. Peak 1: prednisolone acetate (IS); 2: fluticasone propionate (FP)..... 59

LISTA DE TABELAS

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.1

TABLE 1 – Inter-day and between-analysts precision data of RP-LC for fluticasone propionate (FP) in samples of nasal sprays	38
TABLE 2 – Accuracy of RP-LC for fluticasone propionate (FP) in samples of nasal sprays	38
TABLE 3 – Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing.	39
TABLE 4 – Determination of fluticasone propionate (FP) in pharmaceutical formulations by the RP-LC method.....	41

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.2

TABLE I – Inter-day and between-analysts precision data of MEKC for fluticasone propionate (FP) in samples of nasal spray.....	60
TABLE II – Accuracy of MEKC for fluticasone propionate (FP) in samples of nasal spray	61
TABLE III – MEKC conditions and range investigated during robustness testing	62
TABLE IV – Comparison between MEKC and RP-LC methods applied for the analysis of fluticasone propionate (FP) in nasal sprays.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

a.m.u.	Unidade de massa atômica
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APcI	Ionização química a pressão atmosférica
CL	Cromatografia líquida
CL-EM/EM	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
CL-FR	Cromatografia líquida em fase reversa
cm	Centímetro
C _{max}	Concentração plasmática máxima
CMC	Concentração micelar crítica
CV	Coeficiente de variação
CZE	Eletroforese capilar de zona
Da	Daltons
DAD	Detector de arranjo de diodos
EC	Eletroforese capilar
EFS	Extração em fase sólida
ELL	Extração líquido-líquido
EM	Espectrometria de massas
ES	Electrospray
FDA	Food and Drug Administration
h	Hora
HPA	Hipotalâmico-pituitária-adrenal
ICH	International Conference on Harmonisation
IgE	Imunoglobulina E
g	Gramas
kV	Kilovolt
M	Molaridade
mbar	Milibar
MEKC	Cromatografia eletrocínética micelar
mg	Miligramas
min	Minutos

mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MRM	Monitoramento de reação múltipla
m/z	Massa/carga
<i>n</i>	Número de respostas
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
ODS	Octadecilsilano
<i>P</i>	Significância estatística
PF	Propionato de fluticasona
pg	Picograma
PI	Padrão interno
RA	Rinite Alérgica
r^2	Coefficiente de determinação
SDS	Dodecil sulfato de sódio
$T_{1/2}$	Tempo de meia-vida
UV	Ultravioleta
USP	Farmacopéia Americana
XS	Xinafoato de salmeterol
v	Volume
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO ..	13
2 REVISÃO DA LITERATURA ..	16
3 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS ..	27
4 DISCUSSÃO ..	69
5 CONCLUSÕES ..	73
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..	75

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A rinite alérgica (RA) é uma doença inflamatória mediada pela imunoglobulina E (IgE) da mucosa nasal, caracterizada principalmente, por congestão nasal, coriza, espirros e prurido (LEE & ARRIOLA, 1999; SCADDING, 2008). Através da produção de anticorpos específicos da classe IgE e da ativação de mastócitos com conseqüente degranulação de potentes mediadores químicos, substâncias inaladas como poeira, ácaros, polens, ou pêlos de animais desencadeiam uma reação inflamatória e o aparecimento de sintomas característicos da RA (JAAN TAI & WANG, 2003). A RA pode ser classificada como sazonal ou perene. A primeira surge nos pacientes em determinados períodos do ano, dependendo da localização geográfica, condições climáticas e estações do ano, e a segunda – a perene – está associada a fatores ambientais como poeira, pêlos de animais, fungos, ácaros, bem como polens em áreas onde este prevalece durante todo ano (WALLACE *et al.*, 2008). Preparações intranasais contendo glicocorticóides, também chamados de corticosteróides, podem aliviar os sintomas da rinite diminuindo a permeabilidade da membrana e secreção de muco, além de reduzir o número de células inflamatórias e mediadores químicos nas secreções nasais (JAAN TAI & WANG, 2003; PRENNER & SCHENKEL, 2006).

Os corticosteróides são compostos naturais e sintéticos estruturalmente relacionados ao cortisol ou hidrocortisona – principal glicocorticóide secretado pelo córtex da glândula suprarrenal, que se liga a classe de receptores corticosteróides endógenos envolvidos na atividade anti-inflamatória. Além disso, o tratamento da RA por administração tópica tem se constituído recentemente em via alternativa e importante para os fármacos, evitando o metabolismo de primeira passagem hepático e a absorção sistêmica. Nesse contexto, os corticosteróides são usados com redução da dose total necessária para tratar os pacientes, minimizando os efeitos colaterais (BARNES *et al.*, 1998; KROUSE, 2008).

A forma farmacêutica de spray nasal tem sido amplamente utilizada para soluções e suspensões de fármacos. Além disso, devido ao crescente destaque e importância clínica que estes medicamentos vêm conquistando, o desenvolvimento de metodologias para sua avaliação é fundamental para garantir sua segurança e eficácia terapêutica, além de contribuir para o domínio científico e tecnológico da área de controle da qualidade.

Recentemente, foi desenvolvido o propionato de fluticasona (PF), que é um corticosteróide de segunda geração com potente ação anti-inflamatória amplamente utilizado para o tratamento de rinites alérgicas sazonais ou perenes, observando-se atualmente a alta

incidência tanto em adultos como em crianças. Este fármaco é usado topicamente, na forma de spray nasal, visando alcançar maior eficácia terapêutica com baixos níveis de absorção sistêmica, garantindo maior segurança (SZEFLER, 2001).

Os avanços recentes na área farmacêutica viabilizaram a produção de novos fármacos de interesse terapêutico, na qual necessitam de métodos analíticos para sua identificação e determinação quantitativa em produtos farmacêuticos, sendo importantes para o controle da qualidade. A escolha do procedimento baseia-se em vários fatores, que incluem a estrutura e características do fármaco, pureza, quantidade de amostra e finalidade da análise, bem como a disponibilidade de equipamentos e reagentes. O desenvolvimento de métodos envolve a avaliação e otimização de condições, incluindo etapas de preparação da amostra, separação cromatográfica e eletroforética, detecção e quantificação. A validação é necessária para demonstrar, através de estudos experimentais, que o método atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos. Os parâmetros fundamentais de avaliação incluem linearidade, exatidão, especificidade, precisão, recuperação, limites de quantificação e de detecção e teste de adequabilidade do sistema (SHABIR, 2003; ICH, 2005).

A cromatografia líquida (CL), especialmente com detecção no UV, tem sido empregada devido à resolução, precisão e exatidão significativas. Atualmente está sendo utilizada de modo crescente para análise de matéria-prima e produtos farmacêuticos, pois oferece eficiência na quantificação, especificidade, sensibilidade e tempo de ensaio adequados (SHABIR *et al.*, 2007). Por sua vez, a inclusão de análises por eletroforese capilar (EC) pode acrescentar vantagens em relação ao consumo de solventes e tempo de análise, constituindo-se em alternativa moderna aos métodos existentes para o controle de qualidade (LANDERS, 2008).

Desse modo, o presente trabalho teve por objetivos desenvolver e validar procedimentos para avaliação da identidade, pureza e quantificação do PF no produto acabado através da: a) cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR); b) cromatografia eletrocínica micelar; c) comparação entre os resultados dos métodos estudados. Nesse contexto, objetiva estabelecer procedimentos que possam contribuir para o domínio tecnológico e científico, aprimorando a área de controle da qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica dos produtos farmacêuticos.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

Recentemente foi desenvolvido o propionato de fluticasona (PF) representante da segunda geração de corticosteróides, e é denominado quimicamente S-(fluormetil)6 α , 9-difluoro-11 β ,17-dihidroxi-16 α -metil-3-oxoandrosta-1,4-diene-17 β -carbotiato, 17 propionato. É um pó cristalino branco ou quase branco, praticamente insolúvel em água, levemente solúvel em etanol e altamente solúvel em acetona ou diclorometano. Tem ponto de fusão de, aproximadamente, 272°C e é estável à temperatura ambiente. Possui massa molecular de 500,5 g/mol e apresenta fórmula molecular C₂₅H₃₁F₃O₅S, com a estrutura química mostrada na Figura 1 (USP 30, 2007).

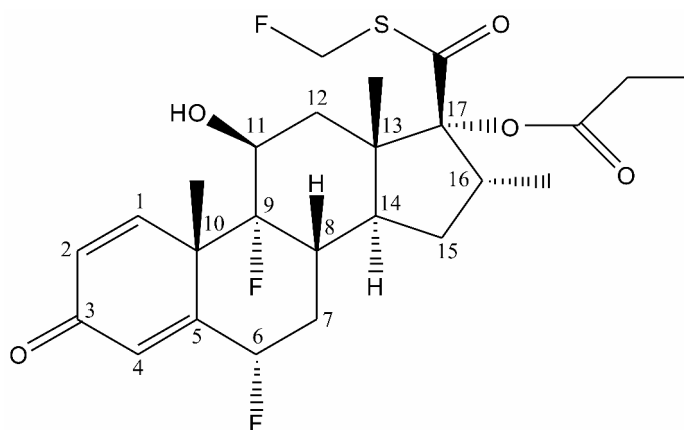


Figura 1. Estrutura química do propionato de fluticasona

A estrutura química básica dos corticosteróides é composta de 3 anéis com 6 carbonos. Existem algumas características comuns a todos os anti-inflamatórios corticosteróides, mas diferentemente de outros compostos, a estrutura do PF está baseada no androstano, núcleo corticosteróide, e não no pregnano. A molécula foi desenvolvida para maximizar a atividade tópica anti-inflamatória e minimizar os efeitos sistêmicos indesejáveis. Esta otimização na atividade é possível por que o PF é rapidamente metabolizado pela enzima Citocromo P450 para o metabólito inativo 17 β -ácido carboxílico (CALLEJAS *et al.*, 1998; JOHNSON, 1998; DERENDORF & MELTZER, 2008). A molécula é altamente lipofílica, com alto grau de ligação e de retenção características no tecido pulmonar humano, com rápida penetração nas células. A eficácia dos agentes inalatórios no trato respiratório depende do local de deposição e das propriedades físico-químicas, que influenciam a velocidade de dissolução, absorção, metabolismo e eliminação (FULLER *et al.*, 1995; DAVIES & FEDDAH, 2003).

O PF possui potente atividade anti-inflamatória e é usado efetivamente por via intranasal, como terapia para a RA perene e sazonal, e também, tem se mostrado eficaz na terapêutica da asma por via tópica limitando os efeitos colaterais associados ao uso de corticosteróides sistêmicos (FULLER *et al.*, 1995; MURNANE *et al.*, 2006). Mais recentemente, têm sido formuladas preparações tópicas para tratamento de dermatoses, incluindo dermatites atópicas e psoríases (HEBERT *et al.*, 2006). Comercialmente, o PF está disponível na forma de suspensão tópica intranasal de 50 µg por dose sob os nomes de Flixonase[®], Plurair[®] e Flutican[®], e Flixotide[®] nas concentrações de 50 e 250 µg por dose. Na forma de creme dermatológico, o PF é comercializado sob o nome de Flutivate[®] 0,5 mg/g e, mais recentemente, o Fluticaps[®] de 50 e 250 µg na forma de cápsulas para uso inalatório oral. Também, o PF pode ser encontrado em associação com o xinafoato de salmeterol em diversas combinações de concentrações, tanto na forma de spray nasal como também, na forma de pó inalatório oral.

Corticosteróides são compostos naturais e sintéticos, estruturalmente relacionados à hidrocortisona, hormônio secretado pelo córtex adrenal. Ligam-se a uma única classe de receptores endógenos envolvidos na atividade anti-inflamatória, alterando a transcrição dos genes, o que aumenta a síntese dos mediadores anti-inflamatórios (transativação) e diminui a síntese dos mediadores pró-inflamatórios (transrepressão gênica) (BARNES *et al.*, 1998; MYGIND *et al.*, 2001; RHEN & CIDLOWSKI, 2005). O mecanismo fundamental que promove a transativação ou a transrepressão gênica inicia-se com o hormônio atravessando a membrana citoplasmática da célula-alvo por difusão passiva. No citoplasma os glicocorticóides ligam-se a receptores protéicos específicos, atuando como fatores de transcrição, alterando a expressão dos genes alvo em resposta a um sinal hormonal específico (De KLOET *et al.*, 1993). Durante a transativação, o complexo glicocorticóide-receptor sofre transformação estrutural e se torna capaz de penetrar no núcleo celular no qual se liga a regiões promotoras de certos genes, induzindo a síntese de proteínas anti-inflamatórias. Já na transrepressão, os monômeros de moléculas de glicocorticóides e receptores de glicocorticóides interagem com fatores de transcrição por interação proteína-proteína promovendo efeito inibitório de suas funções. Dessa forma, a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 6 e interleucina 2, fator de necrose tumoral alfa e prostaglandinas é reduzida (SONG *et al.*, 2005; ALVARENGA *et al.*, 2008).

Os corticosteróides intranasais são os fármacos de maior atividade disponíveis para o tratamento da RA (DERENDORF & MELTZER, 2008; HOCHHAUS, 2008). O desenvolvimento desses fármacos para o tratamento de RA sazonal e perene surgiu da

necessidade de reduzir a dose total necessária para tratar pacientes e minimizar os efeitos adversos. A segunda geração destes compostos inclui o dipropionato de beclometasona, budesonida, flunisolida, furoato de mometasona (ROUMESTAN *et al.*, 2003), triamcinolone e propionato de fluticasona (SZEFLER, 2001), além do furoato de fluticasona (KAISER *et al.*, 2007; GOYAL & HOCHHAUS, 2008; OKUBO *et al.*, *in press*). Os corticosteróides encontram-se disponíveis comercialmente na forma oral, inalatória, intranasal e preparações dermatológicas (BARNES *et al.*, 1998), observando-se que a administração sistêmica está associada a sérios efeitos colaterais. Esses eventos incluem supressão hormonal, supressão da função do eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal (HPA) com possível retardo de crescimento, mudanças na pele e alterações no metabolismo ósseo (SZEFLER, 2001).

A formulação em spray nasal é uma suspensão aquosa que apresenta absorção limitada através da mucosa nasal, devido à baixa velocidade de dissolução e *clearance* mucociliar. Estes fatores combinados com o rápido metabolismo de primeira passagem hepática da porção ingerida do fármaco, contribuem para a baixa biodisponibilidade plasmática (SZEFLER, 2001; FOWLER *et al.*, 2002).

Os parâmetros farmacocinéticos do PF como a disponibilidade sistêmica, liberação e meia-vida podem ser usados para avaliar os efeitos sistêmicos relativos dos corticosteróides intranasais (DERENDORF *et al.*, 2001). Devido à alta lipofilicidade, o PF é pouco absorvido e sua disponibilidade sistêmica é de aproximadamente 1,8% após administração intranasal, com grau de ligação de 90% à albumina plasmática (ALLEN, 2000). Após administração intravenosa, o PF apresentou meia-vida ($T_{1/2}$) de 7,8 h. Estudos indicam que o PF tem significativa supressão do cortisol urinário, mas que não apresenta efeitos detectáveis sobre o eixo HPA nas doses recomendadas, devido ao rápido metabolismo hepático (SZEFLER, 2001; DALEY-YATES *et al.*, 2004; DEMOLY, 2008).

Os corticosteróides inalatórios orais têm alta inativação da dose ingerida pelo efeito de primeira passagem hepático, mas não sofre nenhuma inativação no pulmão. Assim, a biodisponibilidade pulmonar determina a absorção e a bioatividade sistêmica (ROHATAGI *et al.*, 2004). A eficácia dos agentes inalatórios no trato respiratório depende do sítio de deposição e das propriedades físico-químicas do fármaco, controlando a velocidade de dissolução, absorção, metabolismo e eliminação. DAVIES & FEDDAH (2003) estudaram a solubilidade e determinaram o perfil de dissolução de três glicocorticóides, incluindo o PF, a partir de meio preparado semelhante ao fluido intersticial pulmonar humano. O sistema utilizou modelo experimental de dissolução em células de fluxo contínuo com determinação das amostras coletadas por CL-EM/EM. O ensaio mostrou-se adequado para a cinética de

dissolução de compostos poucos solúveis em água, como os glicocorticóides, e também, para estimar o comportamento *in vivo* do fármaco com base em testes *in vitro*.

A RA é definida como uma reação exagerada de uma resposta inflamatória da mucosa nasal ao entrar em contato com determinadas substâncias – alérgenos. A exposição inicial desencadeia a produção de anticorpos específicos da classe IgE, que se unem ao alérgeno levando à degranulação dos mastócitos e a liberação de mediadores pré-formados, como a histamina, e de mediadores recém-sintetizados, como os leucotrienos cisteínicos, causando reação aguda que produz os principais sintomas da RA como congestão nasal, coriza, espirros e prurido (FORNADLEY *et al.*, 1996; CORREN, 2000; SCADDING, 2001; SCADDING, 2008). A RA pode ser classificada como sazonal ou perene. A RA sazonal é causada pela deposição dos alérgenos na mucosa nasal, o que provoca reação de hipersensibilidade imediata, dependendo da localização geográfica e das condições climáticas. Em geral, essa reação não é acompanhada de asma porque as partículas alergênicas são muito grandes para serem inaladas para as vias respiratórias inferiores (BRUNTON *et al.*, 2006). Já, a RA perene está associada a fatores ambientais como poeira, pelos de animais, fungos, ácaros, bem como pólen em áreas onde este prevalece durante todo ano (PRENNER & SCHENKEL, 2006; WALLACE *et al.*, 2008).

A dermatite atópica é uma doença inflamatória de pele bastante comum que afeta crianças e adultos (HEPBURN *et al.*, 1994). Esta afecção é caracterizada por lesões avermelhadas que causam prurido, geralmente em pacientes que apresentam histórico de alergia respiratória. A gravidade da doença está relacionada com casos de estresse, ansiedade e depressão. Recentemente, foram identificados vários fatores de influência sobre doenças alérgicas e atópicas, como a anormal ativação do eixo HPA afetando a interação neuro-imune. Também, uma inflamação local induzida por estresse pode causar interação das fibras nervosas com os mastócitos, possivelmente mediados por neuropeptídeos, assim como, ocorrer aumento da atividade simpática afetando diretamente ou indiretamente a resposta inflamatória (BOETTGER, 2009).

Os corticosteróides de uso tópico constituem-se na primeira escolha para terapia farmacológica da dermatite atópica. Agindo em uma variedade de células imunes, incluindo linfócitos T, monócitos, macrófagos, células dendríticas e seus precursores, suprimem a liberação de citocinas inflamatórias e fornecem controle efetivo através das suas ações anti-inflamatórias, antiproliferativas, imunossupressoras e vasoconstritoras (ISAKSSON, 2004; KRAKOWSKI & DOHIL, 2008).

LANE (1997) realizou estudo para avaliar a eficácia e a segurança de glicocorticóides tópicos em pacientes pediátricos com dermatite atópica. Segundo ele, os corticosteróides de uso tópico possuem potência e efeitos colaterais bastante diversos. Em geral, utiliza-se o fármaco de maior atividade tópica, mas como uma pequena porção sempre é absorvida sistemicamente, os pacientes pediátricos são mais suscetíveis aos efeitos colaterais, devido a maior área de superfície em relação ao peso corporal. Os efeitos colaterais são detectados em pacientes sob tratamento prolongado dos corticosteróides ou em altas doses, podendo ocorrer supressão do eixo HPA e hipocorticismismo e conseqüente retardo hormonal em crianças. Também, pode ocorrer prurido, foliculite, erupções cutâneas, hipopigmentação, estrias, atrofia da pele e supressão adrenal (HEPBURN *et al.*, 1994).

HEBERT *et al.* (2006) avaliaram a supressão adrenal de uma loção 0,05% de PF quando aplicada extensivamente em crianças com moderada ou severa dermatite atópica. O estudo foi realizado em seis laboratórios com total de 44 pacientes (3 a 71 meses de idade) aplicando a loção de PF em 65% da superfície corporal, duas vezes ao dia, durante 4 semanas. A análise da correlação entre as concentrações plasmáticas do PF e dos níveis de cortisol mostrou que o uso contínuo durante 4 semanas não afetou a função do eixo HPA e também não apresentou mudanças na pigmentação da pele.

EICHENFIELD & MILLER (2006) também estudaram os resultados da aplicação diária de uma loção de 0,05% de PF em 438 indivíduos de 3 meses a 87 anos de idade, com duração de 4 semanas. O estudo foi realizado contra um placebo, apresentando eficácia aparente em todos os grupos de estudo, e sem anormalidades clínicas e mudanças significativas na pele. Estes resultados, juntamente com outros estudos utilizando creme e pomada, forneceram mais evidências sobre a segurança e a eficácia do PF. Segundo SPENCER & WISEMAN (1997), o PF é um corticosteróide tópico bem estabelecido em formulações farmacêuticas de cremes e pomadas com uma excelente relação risco/benefício.

BAIN *et al.* (1993) desenvolveram método por radioimunoensaio utilizando extração em fase sólida (EFS) para determinar as concentrações de PF em plasma humano nas fases iniciais dos estudos pré-clínicos. O método apresentou linearidade entre 50-250 pg/mL, mas não apresentou precisão e exatidão adequada nos limites de quantificação inferior e superior.

LI *et al.* (1997) desenvolveram metodologia para determinação de propionato de fluticasona em plasma, utilizando EFS com cartuchos C₁₈ e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM/EM) com ionização química a pressão atmosférica (APcI). O padrão interno (PI) utilizado foi um epímero do acetato de budesonida. O método proposto apresentou linearidade entre 0,2-4 ng/mL e recuperação média de 86,3%.

CALLEJAS *et al.* (1998) estudaram metodologia sensível e rápida para determinação de propionato de fluticasona em plasma. O procedimento foi realizado em sistema robótico de EFS utilizando placas de 96 poços. O PF e o $^{13}\text{C}_3\text{-FP}$ (PI) foram ionizados por eletrospray (ES) em modo positivo e detectados por CL-EM/EM. O método proposto apresentou limite de quantificação de 20 pg/mL e redução no tempo de análise. Os 0,5 mL de plasma humano foram suficientes para monitorar as concentrações sistêmicas do PF nas doses terapêuticas.

LAUGHER *et al.* (1999) otimizaram metodologia para determinação de PF em plasma, utilizando sistema automático de EFS em cartuchos C_{18} por CL-ES-EM/EM. Os extratos foram injetados em coluna C_8 em vazão isocrática de metanol, acetato de amônio e ácido fórmico a 1 mL/min e detectados em m/z 501>293 a.m.u. para o PF e 504>313 a.m.u. para o $^{13}\text{C}_3\text{-FP}$ (PI). O método proposto apresentou linearidade entre 25-500 pg/mL, utilizando 0,5 mL plasma, sendo adequado para aplicação em matriz biológica.

KRISHNASWAMI *et al.* (2000) desenvolveram método sensível e seletivo para quantificação de propionato de fluticasona em plasma humano utilizando CL-APcI-EM/EM como metodologia, a partir de extração em fase sólida, previamente descrita por LI *et al.* (1997). O padrão interno utilizado foi $^{13}\text{C}_3\text{-FP}$, conforme CALLEJAS *et al.* (1998). A recuperação obtida para o PF foi de 81,8% ($n = 6$), com limite de quantificação de 10 pg/mL, e tempo de análise de 2 min. O método validado é rápido e robusto, adequado para estudos farmacocinéticos envolvendo inalação de doses terapêuticas.

TAYLOR *et al.* (2004) desenvolveram método por CL-ES-EM/EM para analisar simultaneamente as concentrações de glicocorticóides sintéticos na urina, soro, plasma e em comprimidos. O método proposto separou eficientemente todos os compostos (dipropionato de beclometasona, betametasona, budesonida, dexametasona, fludrocortisona, flunisolida, fluorometolona, propionato de fluticasona, acetato de megestrol, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triamcinolona e acetona triamcinolona), no entanto, o tempo de análise foi relativamente longo para a CL-EM/EM (15 min), porém justificado para separar os enantiômeros.

Recentemente, foi desenvolvido método para determinação sensível e simultânea da ciclesonida, do metabólito ciclesonida-M1 e do propionato de fluticasona em soro humano utilizando CL-EM/EM, no modo de foto-ionização à pressão atmosférica (APPI). O método foi validado por extração líquido-líquido com éter di-isopropílico, usando 0,5 mL de amostra de soro humano, na faixa de concentração de 10 a 1000 pg/mL para cada composto. Este modo de ionização foi quase quatro vezes mais sensível do que a ionização obtida nos modos APcI e ES, sem diminuição de eficiência do cromatógrafo líquido e também, pela adição de

um agente dopante na fonte de ionização, que facilitou a ionização dos compostos com características mais apolares (MASCHER *et al.*, 2008).

CARTER & ČÁPKA (2008) reportaram dois métodos por CL-EM/EM para a análise de salmeterol e FP em plasma humano utilizando extração em fase sólida. Os métodos foram validados na faixa de 2,5-500 pg/mL para o salmeterol e 5-500 pg/mL para o PF, demonstrando-se adequado para a análise em plasma da formulação combinada de salmeterol e FP, sem apresentar interferências entre os analitos na quantificação.

Para avaliar simultaneamente o PF e o xinafoato de salmeterol (XS) em formulação para inalação, a literatura descreve método por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR), que foi validado observando-se o limite de detecção de 190 ng/mL para o PF e 220 ng/mL para o XS. O método baseou-se em coluna ODS-2 de base desativada (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) com metanol e acetato de amônio 0,6% (75:25) como fase móvel. O tempo de retenção foi de 7,01 min e a recuperação foi de 100,24% para o PF. Além disso, propiciou a determinação de ambos os fármacos sem interferir na detecção e quantificação de cada composto separadamente (MURNANE *et al.*, 2006).

BERNAL *et al.* (1998) realizaram estudo com diferentes métodos para determinar ingredientes ativos e excipientes em sprays nasais. Foram utilizadas as técnicas de CL-FR, EC e espectroscopia no UV, avaliadas pela velocidade de análise, sensibilidade e reprodutibilidade. O método por CL-FR descrito para análise de PF foi desenvolvido utilizando coluna ODS-2 e comprimento de onda de 250 nm, demonstrando ser mais sensível e rápido que as outras técnicas, mas não foi validado e nem demonstrou ser indicador de estabilidade. O método por EC descrito foi aplicado para alguns fármacos, mas não para o PF, assim como o método por espectroscopia no UV.

As farmacopéias americana e britânica (USP 30, 2007; BP, 2007) apresentam métodos semelhantes por CL-FR para análise de matéria-prima de PF e de substâncias relacionadas. Ambos utilizam colunas ODS (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) e temperatura de coluna de 40°C. Os métodos para análise de substâncias relacionadas apresentam poucas diferenças na proporção da eluição em gradiente, que utilizam fase móvel composta de metanol, acetonitrila, água com ácido fosfórico, eluída em gradiente na vazão de 1 mL/min com detecção em 239 nm. Para a determinação do teor sugerem a mesma coluna e temperatura, e fase móvel composta por metanol, fosfato de potássio pH 3,5 e acetonitrila (50:35:15), na vazão de 1,5 mL/min.

Sprays nasais são normalmente caracterizados pela uniformidade de conteúdo por peso, geometria da névoa e tamanho de partículas (GUO & DOUB, 2006). De acordo com o guia do Food and Drug Administration (FDA, 2003) para soluções e suspensões sob a forma

de sprays e aerossóis nasais, fármacos de ação local, a comparabilidade entre produtos pode ser estabelecida a partir de testes e métodos físico-químicos *in vitro*, que podem garantir a segurança e eficácia com maior precisão do que os métodos farmacodinâmicos ou clínicos (WANG *et al.*, 2003). Entretanto, para as suspensões, como os testes disponíveis não possibilitam demonstrar correlação *in vitro-in vivo* devido as partículas dispersas e seu tamanho, são preconizados estudos de bioequivalência. Esses estudos podem ser realizados por CL-EM/EM, devido aos níveis sanguíneos muito baixos, que os fármacos podem apresentar, necessitando desenvolver procedimentos analíticos sensíveis, que viabilizem a quantificação adequada dos fármacos no organismo. Estudos farmacodinâmicos baseados em rinomanometria ou doseamento de parâmetros como cortisol são controversos, e há tendência de não aceitação devido à variabilidade de resposta inerente aos seres humanos e parâmetros clínicos de avaliação (SUMAN *et al.*, 2002; BAID & NIEMAN, 2006; EDSBÄCKER & JOHANSSON, 2006).

Dentre os métodos analíticos, a CL constitui-se em um procedimento bastante utilizado em razão da sua versatilidade. A possibilidade de variação dos mecanismos de separação pela adequada escolha da coluna, fase móvel e método de detecção, permite a utilização desta técnica nas mais diversas fases de estudo de produtos farmacêuticos (COLLINS *et al.*, 2006; SHABIR *et al.*, 2007). Atualmente, apesar da análise de controle da qualidade de medicamentos ser realizada predominantemente utilizando a CL, a EC encontra-se bem estabelecida como técnica analítica, não só por ser considerada uma alternativa à CL, mas também por apresentar vantagens como simplicidade operacional, alta eficiência de separação, baixo consumo de amostras, reagentes e solventes, tempo de análise reduzido e vários modos de separação (MORZUNOVA, 2006).

A EC é uma técnica de separação extremamente útil para análises de pequenas moléculas, especialmente compostos farmacêuticos, além de proteínas, peptídeos, vitaminas, compostos orgânicos e inorgânicos, substâncias quirais e muitos outros. A separação através da EC ocorre pelo movimento do analito no capilar devido ao campo elétrico, e também, do fluxo eletro-osmótico – fluxo total da solução no interior do capilar devido às superfícies carregadas da parede do capilar (MORZUNOVA, 2006). O movimento do analito carregado através de uma solução condutiva é dependente, sobretudo, da carga da substância e da magnitude do campo elétrico aplicado, assim como, da viscosidade do eletrólito e do raio da molécula. Consequentemente, a mobilidade eletroforética intrínseca do composto é determinada pela combinação de forças de atrito e elétricas, indicando que a separação dos componentes de uma mistura está baseada na relação massa/carga dos analitos (HOLLAND,

1997; WÄTZIG & GÜNTER, 2003). Essa técnica assume outras vantagens sobre a CL, uma vez que problemas como alta pressão das bombas, vazamento de solventes e valor elevado das colunas são eliminados (KOWALSKI *et al.*, 2005). Porém, a EC apresenta algumas desvantagens, como uma menor sensibilidade em relação à CL devido ao baixo volume de amostra injetado e também a estreita faixa de detecção ocasionada pelo pequeno diâmetro dos capilares de sílica.

Na EC é possível empregar diversos modos de separação, cada qual com seu mecanismo e seletividade característicos: eletroforese capilar de zona (CZE, *Capillary Zone Electrophoresis*), MEKC – *Micellar Electrokinetic Chromatography*, isotacoforese capilar, focalização isoelétrica capilar, eletroforese capilar em gel e eletrocromatografia capilar (LANDERS, 2008). Compostos neutros, como o PF, não são resolvidos utilizando o modo mais simples de separação – a CZE, necessitando de outro modo de separação: a MEKC. Esse modo de análise é baseado na formação de micelas a partir da adição de um surfactante, tal como o SDS. A partir de uma determinada concentração do surfactante (concentração micelar crítica, CMC), as moléculas começam a agregar-se formando as micelas, que são compostos de carga negativa e os analitos neutros migram contra o fluxo eletro-osmótico (TAVARES, 1997; LANDERS, 2008)

Métodos indicadores de estabilidade são requeridos para monitorar possíveis produtos de degradação que possam surgir devido a interações da substância ativa com os excipientes, processo de produção, embalagens e/ou armazenamento inadequado. Eventualmente, o método indicador de estabilidade necessita ser validado e ser incluído na investigação e aplicação de novos fármacos. Estes métodos devem ser robustos e reunir todos os parâmetros de validação requeridos em cada estágio do desenvolvimento do fármaco e na análise do produto final (ICH, 2003; ICH, 2006; KAZAKEVICH & LOBRUTTO, 2007).

A validação de métodos analíticos é um processo dinâmico e constante que inicia nas fases de seleção, desenvolvimento e otimização das metodologias, qualificação dos instrumentos, materiais e pessoal (RIBANI *et al.*, 2004; SHABIR *et al.*, 2007). Um processo de validação bem definido e documentado fornece evidências objetivas de que o método atende às exigências das aplicações analíticas, sendo adequado para o uso pretendido. Os parâmetros fundamentais avaliados na validação de um método são: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, teste de adequabilidade do sistema, limite de detecção e limite de quantificação (ANVISA, 2003; ERMER & MILLER, 2005; ICH, 2005; ROZET *et al.*, 2007). A capacidade de um método analítico de separar, detectar e quantificar

impurezas ou produtos de degradação também é parâmetro que deverá ser avaliado durante a validação (RAO & NAGARAJU, 2003; ICH, 2006).

Conforme descrito, o PF foi recentemente incluído nas farmacopéias americana e britânica (USP 30, 2007; BP, 2007) e, encontravam-se na literatura, poucos métodos validados para a análise quantitativa em produtos farmacêuticos. Por sua vez, conforme já destacado, há número maior de publicações relativas à determinação em matrizes biológicas. Porém, o desenvolvimento e validação de novas metodologias que aprimorem o controle da qualidade representam contribuição significativa para a área de medicamentos.

As duas publicações científicas efetuadas no contexto da dissertação estão anexadas a seguir, observando-se que os materiais e métodos utilizados, bem como os resultados obtidos, encontram-se descritos nas mesmas.

PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

3 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

3.1 – SANGOI, M. S.; NOGUEIRA, D. R.; SILVA, L. M.; LEAL, D. P.; DALMORA, S. L. Validation of a stability indicating reversed phase LC method for the determination of fluticasone propionate in pharmaceutical formulations. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 31, p. 2113-2127, 2008.

Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies[®], 31: 2113–2127, 2008
Copyright © Taylor & Francis Group, LLC
ISSN: 1082-6076 print/1520-572X online
DOI: 10.1080/10826070802225395

Validation of a Stability Indicating Reversed Phase LC Method for the Determination of Fluticasone Propionate in Pharmaceutical Formulations

**Maximiliano da Silva Sangoi, Daniele Rubert Nogueira,
Lucélia Magalhães da Silva, Diogo Paim Leal,
and Sérgio Luiz Dalmora**

Department of Industrial Pharmacy and Postgraduate Program in
Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria,
Santa Maria-RS, Brazil

Abstract: A reversed phase liquid chromatography (RP-LC) method was validated for the determination of fluticasone propionate (FP) in nasal sprays. The LC method was carried out on a Shim-pack CLC-ODS column (150 mm × 4.6 mm I.D.), maintained at 35°C. The mobile phase consisted of acetonitrile/methanol/phosphate buffer (0.01 M, pH 4.0) (35:35:30, v/v/v), run at a flow rate of 1.0 mL/min and using photodiode array (PDA) detection at 240 nm. The chromatographic separation was obtained with retention time of 6.1 min, and was linear in the range of 0.05–150 µg/mL ($r^2 = 0.9999$). The specificity and stability indicating capability of the method were proven through degradation studies, which also showed that there was no interference of the excipients. The accuracy was 99.36% with bias lower than 1.12%. The limits of detection and quantitation were 0.03 and 0.05 µg/mL, respectively. Moreover, method validation demonstrated acceptable results for precision and robustness. The proposed method was applied for the analysis of the nasal sprays and cream pharmaceutical formulations, contributing to improve the quality control and to assure the therapeutic efficacy.

Correspondence: Sergio Luiz Dalmora, Department of Industrial Pharmacy and Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS 97105-900, Brazil. E-mail: sdalmora@terra.com.br

Keywords: Fluticasone propionate, Pharmaceutical formulations, Reversed phase liquid chromatography, Stability indicating method, Validation

INTRODUCTION

Fluticasone propionate (FP) (Figure 1) is a trifluorinated glucocorticoid specifically designed to provide enhanced anti-inflammatory effects combined with gastrointestinal absorption and fast liver metabolism, providing minimal systemic activity and low nasal bioavailability. The steroid molecule is highly lipophilic, which enhances its penetration into the cells and has a highly binding capacity for the glucocorticoid receptor.^[1,2]

Glucocorticoids, administered by inhalation, remain a first line treatment of patients with seasonal and allergic perennial rhinitis, management of asthma, and advanced chronic obstructive pulmonary disease.^[3-5] More recently, topical FP preparations have been formulated for use in dermatoses, including atopic dermatitis and psoriasis. The FP nasal spray therapy aims to maximize the beneficial therapeutic effects of corticosteroids while minimizing the well known side effects of systemic corticosteroids, such as suppression of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and inhibition of bone formation.^[6,7]

The liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) methods with atmospheric pressure chemical ionization (APCI) were developed and validated for the quantification of FP in human plasma using a combination of protein precipitation and solid phase extraction (SPE).^[8,9] A LC-APCI-MS/MS method coupled to

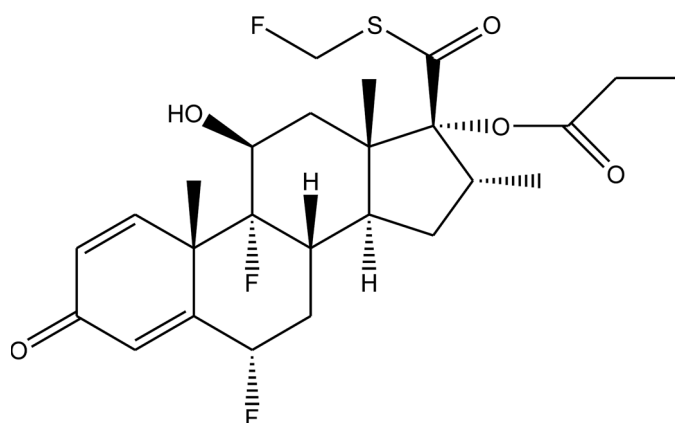


Figure 1. Chemical structure of fluticasone propionate (FP).

an automated SPE system was improved, showing it to be reliable for the analysis of samples from clinical studies.^[10] Also, an LC-MS/MS method with electrospray ionization (ESI), using automated SPE, was developed to monitor systemic concentrations of inhaled FP at therapeutic doses.^[11] A LC-ESI-MS/MS method was also used for the simultaneous detection and quantification of the 14 most frequently used synthetic corticosteroids, including FP, in human serum, plasma, urine, and tablets.^[12]

A reversed phase liquid chromatography method (RP-LC) was developed and validated for the simultaneous determination of salmeterol and FP in combined pressured metered dose inhaler, using a RP ODS-2 base deactivated column, showing the application for the quantification of basic, acidic, and neutral compounds.^[13] A RP-LC method was also performed using a RP ODS-2 column with UV detection at 250nm for the determination of FP in nasal spray formulation,^[14] but the validation was not performed and the stability indicating capability of the method not demonstrated.

The aim of the present study was to develop and validate a simple, accurate, and stability indicating RP-LC method for the quantitative analysis of FP in pharmaceutical nasal sprays, evaluating also the application for the cream formulations, contributing to improve the quality control and to assure the therapeutic efficacy of the pharmaceutical preparations.

EXPERIMENTAL

Chemicals and Reagents

Fluticasone propionate reference substance was supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). A total of four batches of Flixonase[®] (Glaxo Wellcome, Rio de Janeiro, Brazil) nasal sprays, containing 50 µg of FP per dose were identified by Arabic numbers from 1 to 4, and four batches of Flutivate[®] (Glaxo Wellcome, Rio de Janeiro, Brazil) cream formulations, containing 0.5mg of FP per gram of the formulation were identified by Arabic numbers from 5 to 8. The samples were obtained from commercial sources within their shelf life period. HPLC-grade methanol and acetonitrile were obtained from Tedia (Fairfield, Ohio, USA). All chemicals used were of pharmaceutical or special analytical grade. For all the analyses, ultrapure water was purified using an Elix 3 coupled to a Milli-Q Gradient A10 system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Apparatus and Analytical Conditions

The LC method was carried out on a Shimadzu LC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a SCL-10A_{VP} system controller, LC-10 AD_{VP} pump, DGU-14A degasser, SIL-10AD_{VP} autosampler, and a SPD-M10A_{VP} PDA detector. The peak areas were integrated automatically by computer using a Shimadzu Class VP V 6.14 software program. The experiments were performed on a reversed phase Shimadzu (Kyoto, Japan) Shim-pack CLC-ODS column (150 mm × 4.6 mm I.D., with a particle size of 4 μm). A security guard holder was used to protect the analytical column. The Shimadzu LC system was operated isocratically at ambient controlled temperature (35°C) using a mobile phase of acetonitrile/methanol/phosphate buffer (0.01 M, pH 4.0) (35:35:30, v/v/v) run at a flow rate of 1.0 mL/min, and using PDA detection at 240 nm. The injection volume was 20 μL of the solutions containing 50 μg/mL of reference substance and samples, respectively.

Solutions

Preparation of Reference Substance Solution

The stock solution was prepared by weighing accurately, 10 mg of FP reference substance, transferred to individual 10 mL volumetric flasks, and diluted to volume with acetonitrile, obtaining a concentration of 1 mg/mL. The stock solution was stored at 2–8°C protected from light, and daily diluted to an appropriate concentration in mobile phase.

Preparation of Sample Solutions

The sample solutions of FP nasal spray were prepared by weighing accurately 2 g of the formulation containing 50 μg of FP per dose (equivalent to 1000 μg of FP) and diluting to the final volume of 10 mL in volumetric flask with acetonitrile. Then the mixture was vortex mixed for 2 min, sonicated for 5 min, and centrifuged at 5000 × g for 15 min. The final concentration was stored at 2–8°C protected from light, daily filtered through a 0.45 μm membrane filter (Millipore, Bedford, USA), and diluted to an appropriate concentration with mobile phase, injected, and the amount of the drug calculated against the reference substance.

The sample solutions of FP cream were prepared by weighing accurately 1 g of the formulation containing 0.5 mg of FP per gram and adding 90% (v/v) aqueous methanol to obtain a final volume of 10 mL in volumetric flask. The mixture was shaken using a vortex mixer for 5 min,

sonicated for 20 min, and centrifuged at $5000 \times g$ for 15 min. The final concentration was filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ membrane filter, injected, and the amount of the drug calculated against the reference substance.

Validation of the Method

The method was validated using samples of pharmaceutical formulation of nasal spray by the determination of the following parameters: specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), robustness, and system suitability test following the International Conference on Harmonisation (ICH) guidelines.^[15,16]

Specificity

A stability indicating method is defined as an analytical method that accurately quantifies the active ingredients without interference from degradation products, process impurities, excipients, or other potential impurities.^[17] The stability indicating capability of the method was determined by subjecting a reference sample solution ($100 \mu\text{g}/\text{mL}$) to accelerated degradation by acidic, basic, neutral, oxidative, and photolytic conditions to evaluate the interference in the quantitation of FP. After the procedures, the samples were diluted in mobile phase to a final concentration of $50 \mu\text{g}/\text{mL}$. A sample solution prepared in 1 M hydrochloric acid was used for the acidic hydrolysis, and a sample solution in 1 M sodium hydroxide for the basic hydrolysis evaluation. Both solutions were refluxed at 100°C for 4 h, cooled, and neutralized with acid or base, as necessary. For study in the neutral condition, the drug dissolved in water was heated at 80°C for 3 h. The oxidative degradation was induced by storing the samples solutions in 20% hydrogen peroxide, at ambient temperature for 24 h, protected from light. Photodegradation was induced by exposing the samples to 200 watt hours/square meter of near ultraviolet light for 24 h. Then, the stability indicating capability of the method was established by determining the peak purity of FP in the degraded samples using a PDA detector.

Linearity

Linearity was determined by constructing three analytical curves, each one with eight reference substance concentrations of FP, including the LOQ, in the range of $0.05\text{--}150 \mu\text{g}/\text{mL}$ prepared in mobile phase. Before injection of the solutions, the column was equilibrated for at least 20 min with the mobile phase flowing through the system.

Three replicates of 20 μ L injections of the reference solutions were made to verify the repeatability of the detector response. The peak areas of the chromatograms were plotted against the respective concentrations of FP to obtain the analytical curve. The results were subjected to regression analysis by the least squares method to calculate calibration equation and determination coefficient.

Precision and Accuracy

The precision of the method was determined by repeatability and intermediate precision. Repeatability was examined by eight evaluations of the same concentration sample of FP, on the same day, under the same experimental conditions. The intermediate precision of the method was assessed by carrying out the analysis on three different days (inter days) and also by other analysts performing the analysis in the same laboratory (between analysts). The accuracy was evaluated applying the proposed method to the analysis of the in house mixture of the excipients with known amounts of the drug, to obtain solutions at concentrations of 40, 50, and 60 μ g/mL, equivalent to 80, 100, and 120% of the nominal analytical concentration, respectively. The accuracy was calculated as the percentage of the drug recovered from the formulation and also expressed as the percentage relative error (bias %) between the measured mean concentrations and added concentrations.

Limits of Detection and Quantitation

The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were calculated, as defined by ICH,^[15] using the mean values of three independent analytical curves, determined by a linear regression model, where the factors 3.3 and 10 for the detection and quantitation limits, respectively, were multiplied by the ratio from the standard deviation of the intercept and the slope. The LOQ was also evaluated in an experimental assay.

Robustness

The robustness of an analytical procedure refers to its ability to remain unaffected by small and deliberate variations in method parameters and provides an indication of its reliability for the routine analysis. The robustness was determined by analyzing the same samples (50 μ g/mL) under a variety of conditions of the method parameters, such as: flow rate, column temperature, injection volume, mobile phase composition, and mobile phase pH. To assess the stability of sample

Validation of a Stability Indicating Reversed Phase LC Method

2119

solutions of FP, the samples were tested maintained at 2–8°C for 48 h and also placed into the autosampler, at room temperature, for 24 h. The stability of these solutions was studied by performing the experiment and observing any change in the chromatographic pattern, compared with freshly prepared solutions.

System Suitability Test

The system suitability test was also carried out to evaluate the resolution and reproducibility of the system for the analysis to be performed, using five replicates injections of a reference solution containing 50 µg/mL of FP. The parameters measured were peak area, retention time, theoretical plates, and tailing factor (peak symmetry).

Analysis of FP in Nasal Sprays and Cream Formulations

For the quantitation of FP in the pharmaceutical formulations, the respective stock solutions were diluted to appropriate concentration with mobile phase, filtered, injected in triplicate, and the percentage recoveries of the drug calculated against the reference substance.

RESULTS AND DISCUSSION**Optimization of Chromatographic Conditions**

To obtain the best chromatographic conditions, the mobile phase was optimized to provide sufficient selectivity and sensitivity in a short separation time. Phosphate buffer resulted in high sensitivity compared with ammonium acetate buffer and phosphoric acid solution. The use of acetonitrile combined with methanol as organic components resulted in better sensitivity, short analysis time, improving the peak symmetry (about 1.04). For the selection of the best wavelength detection, a PDA detector was used. The optimized conditions of the LC method were validated for the analysis of FP in nasal sprays, due to the capability and application for the quality control.

Method Validation**Specificity and Forced Degradation Studies**

Forced degradations were performed to provide indications of the stability indicating properties of the analytical method, particularly

when there is no information available about the potential degradation products. Figure 2, shows that the acidic and neutral conditions resulted in significant decrease of the area without any additional peak, indicating that the degradation products were not detected by UV. Under the basic and the photolytic conditions, significant decrease of the areas were observed with one additional peak detected for each condition, at 3.5 and 8.6 min, respectively. Under the oxidative condition, FP content exhibited a non significant decrease of the area. Specificity of the method towards the drug was established through determination of purity peak of the drug in working reference solution using a PDA detector. No interference from formulation excipients was found, showing that the peak was free from any coeluting peak, with values of peak purity index higher than 0.9999, thus demonstrating that the proposed method is specific for the analysis of FP.

Linearity

The analytical curves constructed for FP were found to be linear in the 0.05–150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ range. The value of the determination coefficient calculated ($r^2 = 0.9999$, $y = (38317.42 \pm 380.18)x + (1932.05 \pm 264.19)$, where, x is concentration and y is the peak absolute area) indicated the linearity of the analytical curve for the method. Moreover, the relative standard error of slope can be used as a parameter with respect to the precision of the regression, as a general acceptance criterion for the linearity performance of the analytical procedure.^[18] This parameter should be comparable to the relative standard deviation obtained in the evaluation of the precision. The result obtained for the relative standard deviation of the slope is 0.99%, which is lower than the mean value 1.11%, of the RSD of the precision.

Precision

The precision evaluated as the repeatability of the method was studied by calculating the relative standard deviation (RSD) for eight determinations of the 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ performed on the same day and under the same experimental conditions. The RSD value obtained was 0.60%.

The intermediate precision was assessed by analyzing two samples of the nasal sprays on three different days (inter-day); the mean values obtained were 100.01 and 100.23% with RSD 0.53 and 0.68%, respectively. Between analyses, precision was determined by calculating the mean values and the RSD for the analysis of two samples of the nasal spray by three analysts; the values were found to be 100.04 and 100.86% with RSD 0.68 and 0.28%, respectively. The results are shown in Table 1.

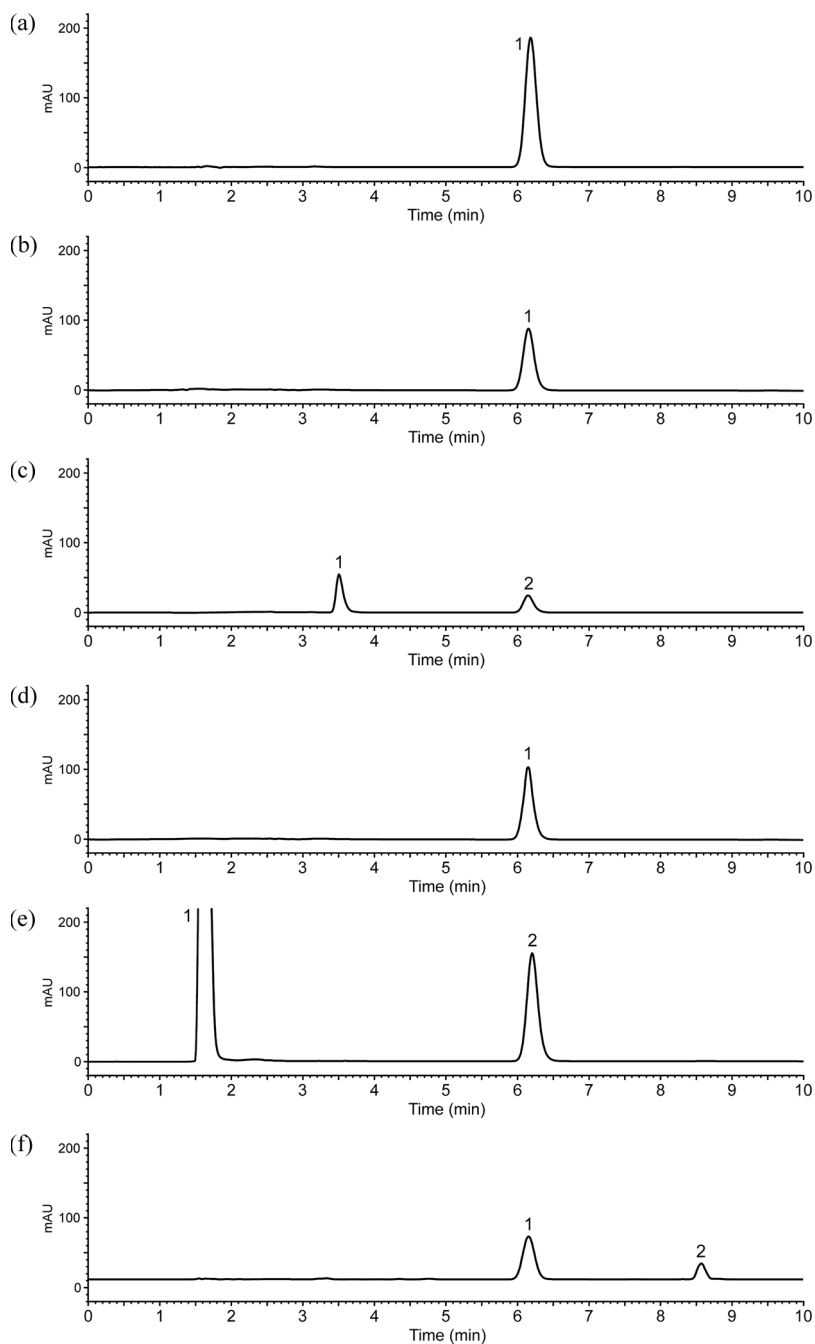


Figure 2. LC chromatograms of FP (50 µg/mL). (a) FP reference substance solution: peak 1 = FP. (b) After acidic hydrolysis: peak 1 = FP. (c) After basic hydrolysis: peaks 1 = degraded form, 2 = FP. (d) After neutral condition: peak 1 = FP. (e) After oxidation: peaks 1 = hydrogen peroxide, 2 = FP. (f) After exposition to UV light: peaks 1 = FP, 2 = photodegraded form.

Table 1. Inter-day and between-analysts precision data of RP-LC for fluticasone propionate (FP) in samples of nasal sprays

Sample	Inter-day			Between-analysts		
	Day	Recovery ^a (%)	RSD ^b (%)	Analysts	Recovery ^a (%)	RSD ^b (%)
1	1	99.88	0.53	A	100.20	0.68
	2	100.59		B	99.53	
	3	99.55		C	100.40	
2	1	100.31	0.68	A	100.73	0.28
	2	100.88		B	100.96	
	3	99.51		C	100.89	

^aMean of three replicates.^bRSD = Relative standard deviation.

Accuracy

The accuracy was assessed from three replicate determinations of three different solutions containing 40, 50, and 60 µg/mL. The absolute means obtained for FP are shown in Table 2, with a mean value of 99.36% and bias lower than 1.12%, demonstrating that the method is accurate within the desired range.

Limits of Detection and Quantitation

For the calculation of the LOD and LOQ, a calibration equation, $y = 38317.42x + 1932.05$, was generated by using the mean values of the three independent analytical curves. The LOD and LOQ were obtained by using the mean of the slope, 38317.42 ± 380.18 , and the standard deviation of the intercept of the independent curves, determined by a

Table 2. Accuracy of RP-LC for fluticasone propionate (FP) in samples of nasal sprays

Nominal concentration (µg/mL)	Mean concentration found ^a (µg/mL)	RSD ^b (%)	Accuracy (%)	Bias ^c (%)
40	39.86	0.79	99.65	-0.35
50	49.44	0.24	98.88	-1.12
60	59.73	0.83	99.55	-0.45

^aMean of three replicates.^bRSD = Relative standard deviation.^cBias = [(Measured concentration - Nominal concentration)/Nominal concentration] × 100.

linear regression line as 264.19. The LOD and LOQ calculated were 0.03 and 0.04 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The LOQ evaluated in an experimental assay, with the precision lower than 5% and accuracy within $\pm 5\%$, was found to be 0.05 $\mu\text{g/mL}$.

Robustness

The results and the experimental range of the selected variables evaluated in the robustness assessment are given in Table 3, together with the optimized values. There were no significant changes in the chromatographic pattern when the modifications were made in the experimental conditions, thus showing the method to be robust. The stability of the sample solutions was studied and the data obtained

Table 3. Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing

Variable	Range investigated	FP ^a (%)	RSD ^b (%)	Optimized value
Flow rate (mL/min)	0.8	99.69	1.12	1.0
	1.0	100.17	0.52	
	1.2	100.08	0.89	
Column temperature (°C)	30	101.34	0.99	35
	35	99.20	0.61	
	40	99.33	1.06	
Injection volume (μL)	10	99.99	1.32	20
	20	100.03	0.64	
	30	99.75	0.52	
Percent acetonitrile	33	99.22	0.89	35
	35	98.33	0.78	
	37	99.17	1.14	
Percent methanol	33	99.10	1.04	35
	35	98.33	0.97	
	37	99.12	0.78	
Mobile phase pH	3.7	98.82	1.55	4
	4.0	99.37	1.03	
	4.3	98.08	0.86	
Solution stability	Autosampler 24 h	102.07	1.82	–
	2–8°C 24 h	100.94	0.79	–
	2–8°C 48 h	101.21	1.03	–

^aMean of three replicates.

^bRSD. = Relative standard deviation.

showed the stability during 24h into the autosampler and during 48h when maintained at 2–8°C.

System Suitability

The system suitability test was carried out to evaluate the resolution and reproducibility of the system for the analysis to be performed, using five replicates injections of a reference substance solution containing 50 µg/mL of FP. The RSD values calculated for the retention time, tailing factor, and peak area were 0.06, 0.14, and 0.24%, respectively. The number of theoretical plates was about 8749, with RSD of 1.15%. The experimental results show that the parameters tested were within the acceptable range (RSD <2.0%), indicating that the system is suitable for the analysis intended.

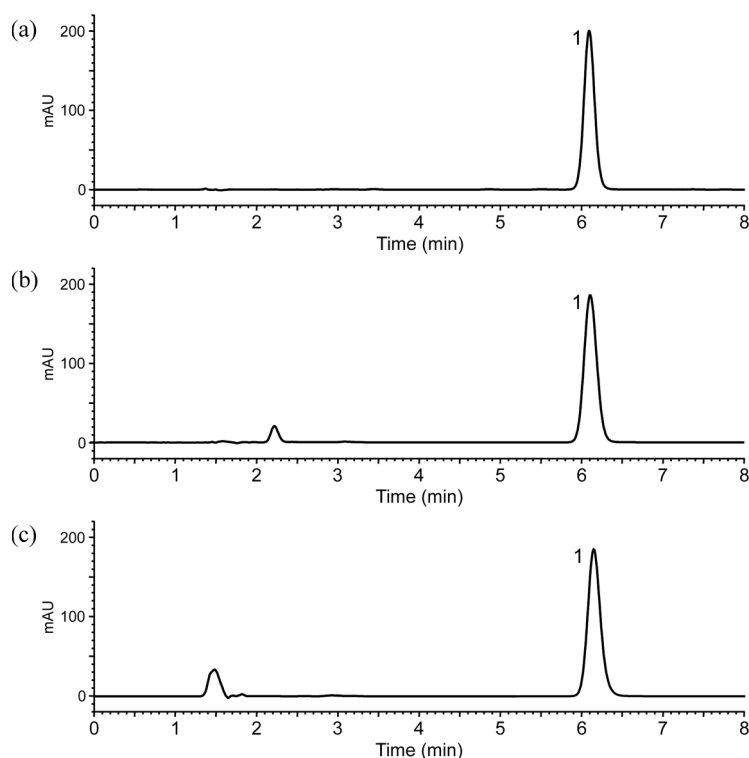


Figure 3. Representative RP-LC chromatograms of FP reference substance solution (a); FP nasal sprays formulations (b) and FP cream formulations (c). Peak 1 = FP (50 µg/mL).

Table 4. Determination of fluticasone propionate (FP) in pharmaceutical formulations by the RP-LC method

Sample	Theoretical amount		Experimental amount		
		FP μg	FP ^a μg	Recovery (%)	RSD ^b (%)
Nasal spray	1	50/dose	49.45/dose	98.91	0.29
	2	50/dose	49.11/dose	98.23	0.43
	3	50/dose	47.98/dose	95.96	0.54
	4	50/dose	50.16/dose	100.33	0.31
Cream	5	500/g	497.89/g	99.58	0.24
	6	500/g	501.68/g	100.34	0.43
	7	500/g	538.50/g	106.50	0.41
	8	500/g	512.03/g	102.41	0.06

^aMean of three replicates.^bRSD = Relative standard deviation.

Method Application

The proposed method was applied for the determination of FP in nasal sprays and also in topical cream formulations, with the retention time of 6.1 min, as shown in the typical chromatograms of Figure 3. The results demonstrated the quality of the pharmaceutical samples and the applicability of the method for the quality control laboratories (Table 4).

CONCLUSION

The results of the validation studies show that the RP-LC method is specific, stability indicating, accurate, and possesses significant linearity and precision characteristics without any interference from the excipients, demonstrating also the advantages of the chromatographic technique, very well established for the quality control of most of the pharmaceuticals due to its simplicity, high resolution, satisfactory precision, and accuracy. Therefore, the proposed method was successfully applied and suggested for the quantitative analysis of fluticasone propionate in pharmaceutical formulations, contributing to improve the quality control and to assure the therapeutic efficacy.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FAPERGS (Fundação

de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) for the financial support.

REFERENCES

1. Johnson, M. Development of fluticasone propionate and comparison with other inhaled corticosteroids. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1998**, *101*, S434–S439.
2. Szefer, S.J. Pharmacokinetics of intranasal corticosteroids. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2001**, *108*, S26–S31.
3. Hebert, A.A.; Friedlander, S.F.; Allen, D.B. Topical fluticasone propionate lotion does not cause HPA axis suppression. *J. Pediatr.* **2006**, *149*, 378–382.
4. Fuller, R.; Johnson, M.; Bye, A. Fluticasone propionate – an update on preclinical and clinical experience. *Respir. Med.* **1995**, *89*, 3–18.
5. Dahl, R.; Nielsen, L.P.; Kips, J.; Foresi, A.; van Cauwenberge, P.; Tudoric, N.; Howarth, P.; Richards, D.H.; Williams, M.; Pauwels, R. Intranasal and inhaled fluticasone propionate for pollen-induced rhinitis and asthma. *Allergy* **2005**, *60*, 875–881.
6. Prenner, B.M.; Schenkel, E. Allergic rhinitis: treatment based on patient profiles. *Am. J. Med.* **2006**, *119*, 230–237.
7. Fowler, P.D.; Gazis, A.G.; Page, S.R.; Jones, N.S. A Randomized double-blind study to compare the effects of nasal fluticasone and betamethasone on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and bone turnover in patients with nasal polyposis. *Clin. Otolaryngol.* **2002**, *27*, 489–493.
8. Li, Y.N.; Tattam, B.N.; Brown, K.F.; Seale, J.P. A sensitive method for the quantification of fluticasone propionate in human plasma by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1997**, *16*, 447–452.
9. Krishnaswami, S.; Möllmann H., Derendorf, H.; Hochhaus, G. A sensitive LC-MS/MS method for the quantification of fluticasone propionate in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *22*, 123–129.
10. Laugher, L.; Noctor, T.G.; Barrow, A.; Oxford, J.M.; Phillips, T. An improved method for the determination of fluticasone propionate in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *21*, 749–758.
11. Callejas, S.L.; Biddlecombe, R.A.; Jones, A.E.; Joyce, K.B.; Pereira, A.I.; Pleasance, S. Determination of the glucocorticoid fluticasone propionate in plasma by automated solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **1998**, *718*, 243–250.
12. Taylor, R.L.; Grebe, S.K.; Singh, R.J. Quantitative, highly sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for detection of synthetic corticosteroids. *Clin. Chem.* **2004**, *50*, 2345–2352.
13. Murname, D.; Martin, G.P.; Marriot, C.J. Validation of a reverse-phase high performance liquid chromatographic method for concurrent assay of a weak base (Salmeterol Xinafoate) and a pharmacologically active steroid (Fluticasone Propionate). *Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *40*, 1149–1154.

14. Bernal, J.L.; Nozal, M.J.; Martín, M.T.; Diez-Masa, J.C.; Cifuentes, A. Quantitation of active ingredients and excipients in nasal sprays by high-performance liquid chromatography, capillary electrophoresis and UV spectroscopy. *J. Chromatogr. A* **1998**, *823*, 423–431.
15. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), November 2005; 1–13.
16. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use, Stability Testing of New Drugs Substance and Products Q1A(R2), February 2003; 1–18.
17. Alsante, K.M.; Ando, A.; Brown, R.; Ensing, J.; Hatajik, T.D.; Kong, W.; Tsuda, Y. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 29–37.
18. Ermer, J.; Ploss, H.J. Validation in pharmaceutical analysis part II: central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *37*, 859–870.

Received December 5, 2007

Accepted January 23, 2008

Manuscript 6264

3.2 – SANGOI, M. S.; SILVA, L. M.; D'AVILA, F. B.; DALMORA, S. L. Determination of fluticasone propionate in nasal sprays by a validated stability-indicating micellar electrokinetic chromatography method. **Journal of Chromatographic Science**, *in press*.

**Determination of Fluticasone Propionate in Nasal Sprays by a Validated
Stability-indicating Micellar Electrokinetic Chromatography Method**

Maximiliano da Silva Sangoi, Lucélia Magalhães da Silva, Felipe Bianchini D'Avila, and
Sérgio Luiz Dalmora*

*Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa
Maria-RS, Brazil*

* Author to whom correspondence should be addressed: e-mail sdalmora@terra.com.br

Abstract

A micellar electrokinetic chromatography method (MEKC) is developed and validated for the analysis of fluticasone propionate (FP) in nasal sprays. The MEKC method is performed on a fused-silica capillary (50 μm i.d.; effective length, 40 cm). The background electrolyte consists of 25 mM borate and 25 mM anionic detergent SDS solution at pH 9. The capillary temperature is maintained at 35 $^{\circ}\text{C}$ and the applied voltage is 20 kV; the injection is performed using the hydrodynamic mode at 50 mbar for 6 s, with detection at 238 nm. The method is linear in the range of 2-80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($r^2 = 0.9956$). The specificity and stability-indicating capability are proven through forced degradation studies inclusive by mass spectrometry, which also show that there is no interference of the excipients. The limit of detection and limit of quantitation are 0.56 and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Moreover, method validation demonstrates acceptable results for the accuracy, precision and robustness. The proposed method was successfully applied for the quantitative analysis of FP nasal sprays, and the results were compared to a validated reversed-phase liquid chromatographic method, showing non-significant difference ($P > 0.05$).

Keywords: fluticasone propionate; liquid chromatography; micellar electrokinetic chromatography; stability-indicating method; validation.

Introduction

The corticosteroids are natural and synthetic compounds structurally related to hydrocortisone, which bind to a single class of endogenous corticosteroid receptors involved in anti-inflammatory activity (1).

Fluticasone propionate (FP) (Figure 1) is a trifluorinated glucocorticoid based on the androstane nucleus with potent anti-inflammatory activity. Clinically is used intranasally, as effective therapy for seasonal and allergic perennial rhinitis, and by inhaled route for the management of asthma (2,3). Rhinitis is one of the major chronic upper respiratory tract disorders, recognized to substantially affect quality of life and to impair both physical and cognitive functioning in adults (4,5).

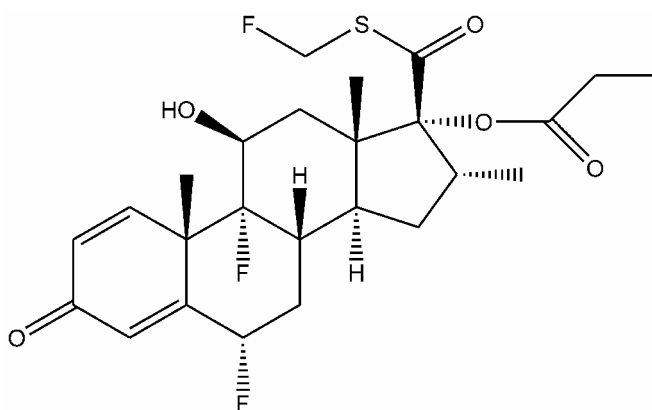


Figure 1. Chemical structure of fluticasone propionate (FP).

A radioimmunoassay with solid-phase extraction (SPE) method was used to determine the concentrations of FP in plasma in the early phases of the clinical trials (6). The liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method with atmospheric pressure chemical ionization (APCI) were developed and validated for the quantitation of FP in human plasma using a combination of protein precipitation with SPE and also coupled to an automated SPE system over the concentration range of 25-500 pg/mL (7,8). A sensitive and

selective LC-APCI-MS/MS method was also validated to quantify FP at levels lower than 10 pg/mL (9). Besides, a LC-MS/MS method with electrospray ionization (ESI) using automated SPE was also developed to monitor systemic concentrations of inhaled FP at therapeutic doses (10). A LC-ESI-MS/MS method was developed for the simultaneous detection and quantification of the 14 most frequently used synthetic corticosteroids, including the FP, in human serum, plasma, urine and tablets (11). A reversed-phase liquid chromatographic method (RP-LC) method was developed and validated for the simultaneous determination of salmeterol xinafoate and FP in combined pressurized metered dose inhaler, using a RP ODS-2 base-deactivated column, showing the application for the quantification of basic, acidic and neutral compounds (12). A RP-LC method for the analysis of nasal spray formulations was also studied and performed on a RP ODS-2 column including FP only in a chromatogram (13). Recently, a RP-LC method was developed and validated using a CLC-ODS column with UV detection at 240 nm and applied for the determination of FP in pharmaceutical formulations showing high sensitivity and fast analysis time (14).

Capillary electrophoresis (CE) has emerged as a powerful analytical technique for pharmaceutical analysis, allowing the determination of the active pharmaceutical ingredients, impurities, and chiral analysis, with some advantages related to the existing methodologies (15,16). As at the moment there is no published CE method for the determination of the drug, the aim of the present study was to develop and validate a stability-indicating micellar electrokinetic chromatography (MEKC) method for the determination of FP in nasal sprays, establishing comparison with the validated RP-LC method, and contributing to the research of new alternatives with advantages for the quality control of pharmaceutical formulations.

Experimental

Chemicals and reagents

The FP reference substance was supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), and prednisolone acetate (PA) reference substance (IS) was purchased from United States Pharmacopoeia (Rockville, Maryland, USA). A total of four batches of Flixonase[®] (GlaxoSmithKline, Rio de Janeiro, Brazil) nasal sprays, containing 50 µg of fluticasone propionate per dose were obtained from commercial sources within their shelf-life period, and identified by Arabic numbers from 1 to 4. Ultrapure SDS and analytical grade boric acid were acquired from Bio-Rad Labs (Hercules, California, USA) and Merck (Darmstadt, Germany), respectively. All chemicals used were of pharmaceutical or special analytical grade. For all of the analyses, ultrapure water was purified using an Elix 3 coupled to a Milli-Q Gradient A10 system (Millipore, Bedford, Massachusetts, USA). All solutions were degassed by ultrasonication (Tecnal, São Paulo, Brazil) and filtered through a 0.22 µm Millex filter (Millipore).

Apparatus

CE experiments were performed on an Agilent^{3D}CE apparatus (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with an autosampler, a photodiode array (PDA) detector, a temperature controlling system (4-60 °C) and power supply able to deliver up to 30 kV. CE ChemStation software was used for instrument control, data acquisition and analysis. The pH of the solutions was measured by a pH-meter (Thermo Orion, Beverly, Massachusetts, USA).

The RP-LC method was carried out on a Shimadzu LC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a SCL-10A_{VP} system controller, a LC-10 AD_{VP} pump, a DGU-14A degasser, a SIL-10AD_{VP} autosampler, and a SPD-M10A_{VP} PDA detector. The peak areas were integrated automatically by computer using a Shimadzu Class VP V 6.14 software program.

The mass spectrometry (MS) experiments were performed on a triple quadrupole mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK), model Quattro LC, equipped with an atmospheric pressure chemical ionization (APCI) source in positive mode, set up in scan mode, using a Masslynx (v 3.5) software program. A syringe pump (KD Scientific, Holliston, MA, USA) was used to infuse the samples.

Preparation of reference substance solutions

The reference substance solutions were prepared by weighing accurately, 10 mg of FP and PA reference substances, transferred to individual 10 mL volumetric flasks and diluted to volume with acetonitrile, obtaining concentrations of 1 mg/mL. The stock solutions were stored at 2-8 °C, protected from light and daily diluted to an appropriate concentration with background electrolyte (BGE) solution.

Preparation of sample solutions

The sample solutions of FP nasal spray were prepared by weighing accurately 3.2 g of the formulation equivalent to 1600 µg of FP and diluting to the final volume of 10 mL in volumetric flask with acetonitrile. Then the mixture was vortex mixed for 2 min, sonicated for 5 min and centrifuged at 5000 x g for 15 min. The sample solution prepared with the final concentration of 160 µg/mL of the FP was stored at 2-8 °C, protected from light and daily diluted to an appropriate concentration with BGE, injected and the amount of the drug calculated against the reference substance.

Preparation of BGE solution

The optimized BGE solution was prepared weighing separately boric acid and SDS quantities, respectively equivalent to 25 mM and dissolving in 40 mL of ultrapure water. The

pH was adjusted to 9 by adding 0.1 M sodium hydroxide and the volume completed to 50 mL with ultrapure water. The solution was daily prepared and filtered.

Electrophoretic procedure

All experiments were carried out on a fused-silica capillary with 50 μm i.d. and 48.5 cm of total length (effective length 40 cm), thermostated at 35 $^{\circ}\text{C}$, and detection at 238 nm using a PDA detector. At the beginning of each working day, the capillary was conditioned by rinsing with 0.1 M sodium hydroxide for 20 min, followed by water for 20 min, and then with running electrolyte solution for 20 min. To achieve high migration time reproducibility between injections, the capillary was conditioned with 0.1 M sodium hydroxide (2 min), water (1 min), and a running BGE solution (5 min). Samples were injected using the hydrodynamic injection for 6 s at 50 mbar and a constant voltage of 20 kV (current about 16 μA) was applied during the analysis. Since electrolysis can change the electroosmotic flow (EOF) and affect the migration time, efficiency and selectivity, after each three injections the running electrolyte solution was replaced by a fresh solution.

RP-LC procedure

The validated RP-LC method applied for the analysis of FP in nasal sprays is described elsewhere (14). The elution was carried out on a RP Shimadzu (Kyoto, Japan) Shim-pack CLC-ODS column (150 mm x 4.6 mm i.d., with a particle size of 4 μm). A security guard holder was used to protect the analytical column. The Shimadzu LC system was operated isocratically at controlled temperature of 35 $^{\circ}\text{C}$ using a mobile phase of acetonitrile/methanol/phosphate buffer (0.01 M, pH 4) (35:35:30, v/v/v) run at a flow-rate of 1.0 mL/min, and using PDA detection at 240 nm. The injection volume was 20 μL of the solutions containing 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for both the reference substance and the samples.

Mass spectrometry procedure

The mass spectrometer conditions were optimized with the direct injection of the FP reference solution (1000 ng/mL) into the system. The best response was obtained with a corona potential of 3.5 kV, a cone voltage of 25 V, a RF lens voltage of 0.6 V, a source temperature of 130 °C, and APCI probe temperature of 450 °C, respectively. Before the analysis, the samples were diluted to 1:10 in methanol:water (80:20, v/v), and introduced into the mass spectrometer by direct infusion at 10 μ L/min. The mass spectrometry data were acquired in the m/z range between 50 and 600.

Validation of the MEKC method

The method was validated using samples of pharmaceutical formulation of nasal spray by determinations of the following parameters: specificity, linearity, range, precision, accuracy, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), robustness, stability, and system suitability test, following the International Conference on Harmonization (ICH) guidelines (17,18).

The stability-indicating capability of the method was determined by subjecting a reference substance solution (200 μ g/mL) to accelerated degradation by acidic, basic, neutral, oxidative, and photolytic conditions to evaluate the interference in the quantitation of FP. A sample solution prepared in 0.1 M hydrochloric acid was used for acidic hydrolysis, and a sample solution in 0.1 M sodium hydroxide for the basic hydrolysis evaluation. Both solutions were maintained at ambient temperature for 6 h and neutralized with acid or base, as necessary. For the study under neutral condition, the reference solution was diluted in water and heated at 80 °C for 4 h. Oxidative degradation was induced by storing the solutions in 5% hydrogen peroxide, at ambient temperature for 24 h, protected from light. Photodegradation was induced by exposing the sample to 200 Wh/m² of near-ultraviolet light for 24 h. The

solutions were diluted with the electrolyte solution to final concentrations of 40 $\mu\text{g/mL}$. The interference of the excipients of the pharmaceutical formulation was determined by the injection of a sample containing only placebo (in-house mixture of all the spray excipients) and a sample containing placebo added with FP at a concentration of 40 $\mu\text{g/mL}$. Then, the specificity of the method was established by determining the peak purity of FP in the degraded samples using a PDA detector. Additionally, the FP reference standard and the degraded samples were respectively analyzed by MS.

Linearity was determined by constructing three calibration curves each one with seven calibration points of FP, including the LOQ, in the range of 2-80 $\mu\text{g/mL}$ prepared in BGE solution. Three replicate injections of each reference substance solution spiked with PA 40 $\mu\text{g/mL}$ as IS, were made to verify the repeatability of the detector response. The peak area ratio of FP reference substance to the IS, against the respective reference concentrations was used for plotting the graph, and the linearity evaluated by the least square regression analysis.

The precision of the method was determined by repeatability and intermediate precision. Repeatability was examined by nine evaluations of the same concentration sample of FP, on the same day, under the same experimental conditions, calculating the relative standard deviation (RSD) of the migration time and peak area ratio for the concentration of 40 $\mu\text{g/mL}$. The intermediate precision of the method was assessed by carrying out the analysis on three different days (inter-days), and also by other analysts performing the analysis on the same day and in the same laboratory (between-analysts).

The accuracy was evaluated by applying the proposed method to the analysis of an in-house mixture of the spray excipients with known amounts of each drug, to obtain solutions at concentrations of 32, 40, and 48 $\mu\text{g/mL}$, equivalent to 80, 100, and 120%, of the analytical concentrations, respectively. The accuracy was calculated as the percentage of the drug recovered from the formulation matrix.

The LOQ and the LOD were calculated from the slope and the standard deviation of the intercept of the mean of three calibration curves, determined by a linear regression model, as defined by ICH (17). The LOQ was also evaluated in an experimental assay.

The robustness of an analytical procedure refers to its ability to remain unaffected by small and deliberate variations in method parameters and provides an indication of its reliability for the routine analysis (19,20). The robustness was determined by analyzing the same samples of the FP reference solution containing 40 µg/mL in triplicate by the one-variable-at-a-time approach changing electrolyte composition (± 1 mM), capillary temperature (± 2 °C), voltage applied (± 1 kV), injected time (± 1 s), and detection wavelength (± 2 nm).

To assess the stability of FP, the stability studies were performed maintaining the FP reference solution in acetonitrile for two months at 2-8 °C, protected from light, and the stability of FP in BGE was assessed after the storage of the samples for 48 h at 2-8 °C, and also placed into the autosampler for 24 h at room temperature.

A system suitability test was carried out to evaluate the resolution and reproducibility of the system for the analysis to be performed, using five replicates injections of a reference substance solution containing 40 µg/mL of FP. The parameters measured were peak area, retention time, theoretical plates and tailing factor (peak symmetry).

Analysis of FP in nasal sprays

For the quantitation of FP in the nasal sprays, the respective stock solutions were diluted to appropriate concentration with BGE, filtered, injected in triplicate and the percentage recoveries of the drug calculated against the reference substance.

Results and discussion

Optimization of the electrophoretic conditions

To compensate injection errors and improve the reproducibility of the MEKC method, several drugs including betamethasone acetate, hydrocortisone acetate, clobetasol propionate, and deflazacort were tested as IS for validation procedures of FP. Prednisolone acetate, also a corticosteroid, was selected as IS due to its suitable peak resolution and migration time.

To obtain the optimum capillary electrophoretic conditions, some electrolyte solutions containing sodium phosphate, sodium citrate, sodium acetate, sodium tetraborate, or boric acid, respectively, were investigated adding the surfactant SDS for the solubilization of the analyte by the micelles, in the pH range from 4-10.5. Best results were obtained with the borate solution. The pH of the BGE solution containing 25 mM boric acid and SDS which affects the ionization of the analyte and the magnitude of the EOF was evaluated as shown in Figure 2. The pH 9 was selected since higher pHs resulted in decrease of the migration time and peak width, but with peak asymmetry. The effect of BGE concentration was studied in the range from 15 to 40 mM at constant 25 mM SDS concentration at pH 9. As the migration time increased with the increase of the borate solution concentration, the 25 mM borate solution was selected. Then, the influence of the SDS was investigated (Figure 3) showing that the migration time of FP increased with the increase of the concentrations due to the interaction of the analyte with the micelles, achieving better efficiency combined with short analysis time with 25 mM SDS. To investigate the effect of organic modifiers, 5-20% (v/v) concentrations of methanol and acetonitrile were added to the 25 mM borate and 25 mM SDS solution (pH 9) showing no improvements. The effect of the voltage was investigated from 10 to 30 kV, which showed shorter analysis time, better separation efficiencies, and higher currents with up to 20 kV potential, giving also the best peak parameters and acceptable current (about 16 μ A), without Joule heating. The capillary temperature was investigated within 20 and 45 °C, and the temperature of 35 °C was chosen. The sample solutions were hydrodynamically injected

at 50 mbar changing the injection time between 3 to 8 s, showing increased peak width and shape deformed after 6 s, thus selected as 6 s.

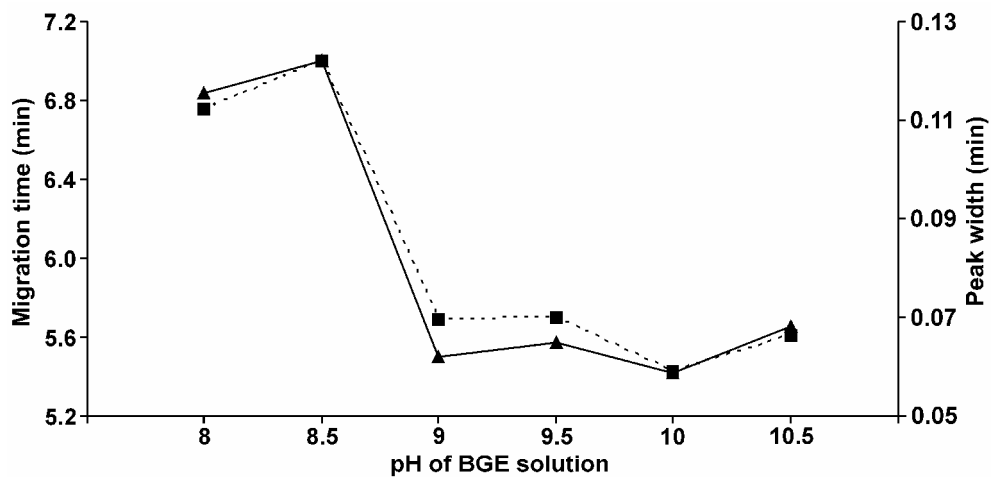


Figure 2. Effect of BGE solution pH on migration time (■) and peak width (▲) of FP. Operating conditions: 25mM borate and 25mM SDS solution (pH 9), hydrodynamic injection (6 s at 50 mbar), 20 kV, 35 °C, and 238 nm. FP: 40 µg/mL.

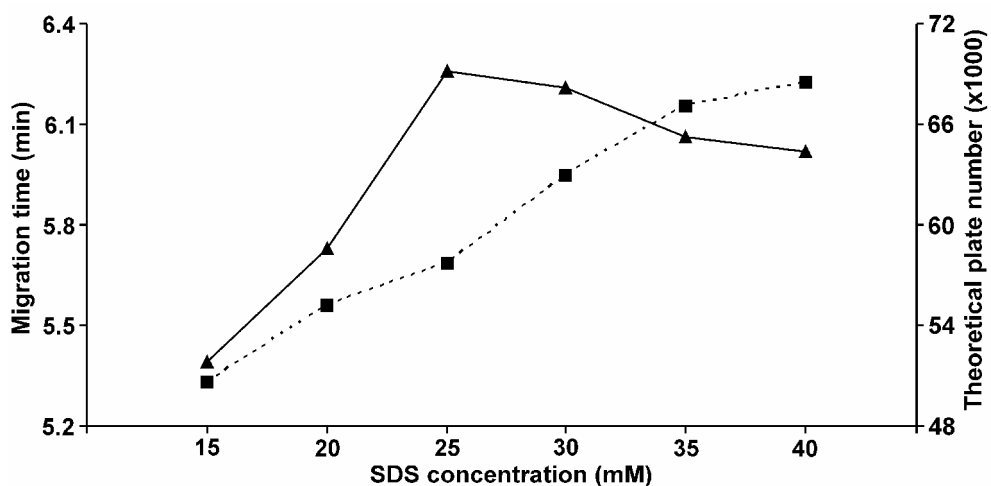


Figure 3. Effect of SDS concentration on migration time (■) and theoretical plate number (▲) of FP.

As demonstrated, the MEKC method parameters were optimized to obtain the best peak area, resolution and symmetry, combined with short migration time, achieved with the 25 mM borate and 25 mM SDS solution at pH 9, with detection at 238 nm. The electropherogram of

FP reference substance and IS with migration times of 5.6 and 5.1 min, respectively is shown in Figure 4.

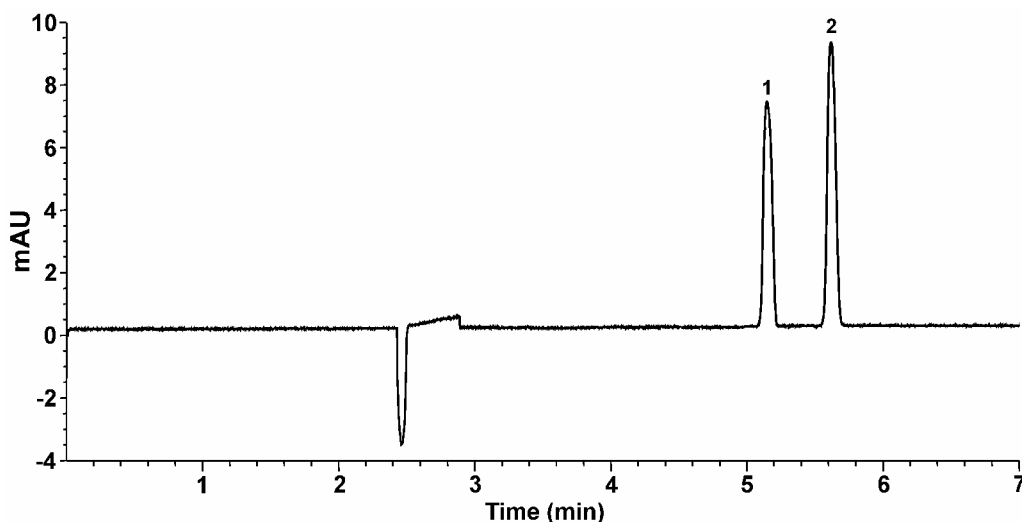


Figure 4. Representative electropherogram of a reference substances solution containing (1) prednisolone acetate (IS) and (2) fluticasone propionate (FP) at a concentration of 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Method validation

A stability-indicating method is defined as an analytical method that accurately quantifies the active ingredients without interference from degradation products, process impurities, excipients, or other potential impurities (21). The stressed acidic condition (Figure 5a) showed significant decrease of the peak area without any additional peak, as well the basic condition (data not shown). The neutral heated degradation hydrolysis showed also significant decrease at 4 h, without any additional peak (Figure 5b). Under photolytic condition (Figure 5c) nearly 51% of the FP was degraded, but no additional peak was identified. For the oxidative condition (Figure 5d), 76% of the FP was degraded at 24 h, without any additional peak. The basic and photolytic conditions showed, respectively an additional peak as detected by RP-LC method (14), indicating that the degradation products did not migrate in the MEKC method. Moreover, if or when present they will not interfere in

the analysis as the specificity of the method towards the drug was also established through determinations of peak purity of the analyte obtained by overlay of the spectra captured at the apex, upslope and downslope using a PDA detector. The FP reference substance and degradation samples were also analyzed by APCI-MS in the positive mode, but the degraded products were not ionized/detected or their molecular weights were out of the lower mass range used in the study. Besides, no interference from formulation excipients, mainly benzalkonium chloride and phenylethyl alcohol, was also demonstrated, showing that the peak was free from any coeluting peak, with values of peak purity index in the range of 0.999-1, thus confirming that the proposed method is specific for the analysis of FP.

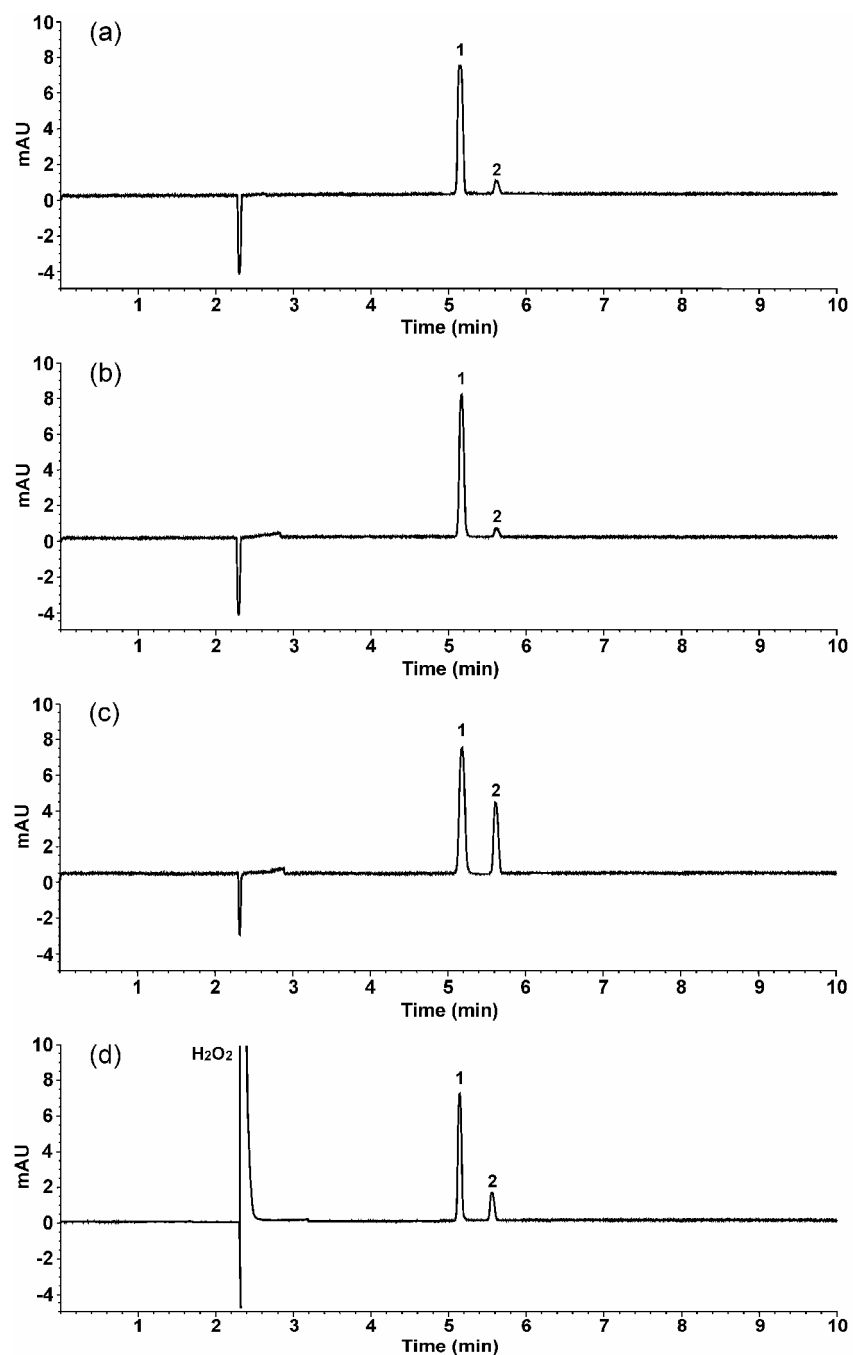


Figure 5. MEKC electropherograms of FP. After: (a) acidic hydrolysis; (b) neutral heated hydrolysis; (c) photodegraded condition; (d) oxidative condition. Peak 1: prednisolone acetate (IS); 2: fluticasone propionate (FP).

The calibration curves constructed for FP were found to be linear in the 2-80 $\mu\text{g/mL}$ range. The value of the calculated determination coefficient ($r^2 = 0.9956$, $y = 0.0341 \pm$

$0.0017x - 0.0706 \pm 0.0064$, where, x is concentration and y is the peak area ratio of FP to IS) indicated the linearity of the calibration curve for the method.

The precision, evaluated as the repeatability of the method, was studied obtaining RSD values of 0.22 and 0.84% for the migration time and the peak-area ratio, respectively. The intermediate precision was assessed by analyzing two samples of the nasal sprays on three different days (inter-days) giving mean values of 99.86 and 99.87% with RSD 0.73 and 1.17%, respectively. Between analysts precision was determined by calculating the mean values and the RSD for the analysis of two samples of the nasal spray by three analysts; the values were found to be 100.06 and 99.82% with RSD 1.35 and 0.96%, respectively. The results are shown in Table I.

Table I. Inter-day and between-analysts precision data of MEKC for fluticasone propionate (FP) in samples of nasal spray						
Sample	Inter-day			Between-analysts		
	Day	Recovery* (%)	RSD [†] (%)	Analysts	Recovery* (%)	RSD [†] (%)
1	1	99.01	0.73	A	98.62	1.35
	2	100.25		B	100.27	
	3	100.31		C	101.30	
2	1	100.27	1.17	A	99.08	0.96
	2	98.55		B	99.49	
	3	100.79		C	100.90	

* Mean of three replicates.
[†] RSD = relative standard deviation.

The accuracy was assessed from three replicate determinations of the three different solutions, and the absolute means obtained for FP are shown in Table II with a mean value of 100.37% and bias lower than 1.47%, demonstrating that the method is accurate within the desired range (22).

Nominal concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Mean concentration found* ($\mu\text{g/mL}$)	RSD [†] (%)	Accuracy (%)	Bias [‡] (%)
32	32.21	1.77	100.67	0.67
40	40.59	1.05	101.47	1.47
48	47.50	0.43	98.96	-1.04

* Mean of three replicates.
[†] RSD = relative standard deviation.
[‡] Bias = [(measured concentration - Nominal concentration)/Nominal concentration] x 100.

For calculating the LOD and LOQ, the calibration equations were generated by using the mean values of the three independent calibration curves. The obtained values were 0.56 and 1.86 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The LOQ, evaluated experimentally, with a precision lower than 5% and an accuracy within $\pm 5\%$ (23,24), was found to be 2.0 $\mu\text{g/mL}$, suitable for the quality-control analysis, but the low sample injection volume and the short optical path-length can be related to the low sensitivity of the MEKC method.

The results and the experimental range of the selected variables evaluated in the robustness assessment are given in Table III, together with the optimized values. There were non-significant changes of the results and in the electropherogram pattern, testing also different capillary batches, indicating that the proposed method is robust under the conditions tested.

Table III. MEKC conditions and range investigated during robustness testing					
Variable	Range investigated	FP peak area ratio		FP migration time (min)	Optimized condition
		FP* (%)	RSD [†] (%)		
Electrolyte solution	8.9	99.66	0.39	5.52	9
pH	9	100.14	0.55	5.62	
	9.1	99.96	0.63	5.67	
Electrolyte solution	24	100.48	0.26	5.60	25
concentration (mM)	25	100.12	0.47	5.62	
	26	99.41	1.07	5.64	
SDS concentration	24	100.64	1.87	5.57	25
(mM)	25	99.46	0.45	5.61	
	26	101.23	0.74	5.64	
Temperature (°C)	33	98.74	1.80	5.65	35
	35	100.38	0.62	5.62	
	37	100.82	1.21	5.59	
Voltage (kV)	19	98.18	0.83	5.66	20
	20	100.25	0.53	5.62	
	21	100.43	1.35	5.58	
Time injection (s)	5	98.75	1.68	5.61	6
	6	100.49	0.71	5.62	
	7	101.49	1.72	5.64	
Wavelength (nm)	236	100.75	0.94	5.62	238
	238	101.02	0.65	5.62	
	240	100.4	1.82	5.62	

* Mean of three replicates.
[†] RSD = relative standard deviation.

The stability studies showed the stability of the working solution with loss of content lower than 0.5% for two months. The stability of FP in BGE was assessed after the storage of the samples for 48 h at 2-8 °C, and also placed into the autosampler for 24 h at room temperature, showing non-significant change (< 2%) relative to freshly prepared samples as suggested (25).

The system suitability test carried out for the migration time, peak area and peak symmetry showed RSD values of 1.04, 1.49 and 1.92%, respectively. The number of theoretical plates was about 63954, with RSD of 1.45%. The parameters tested were within the acceptable range (RSD < 2.0%), indicating that the method is suitable for the analysis intended.

Method application

The validated MEKC method was applied for the determination of FP in nasal sprays and the results compared to those obtained using a validated RP-LC method giving mean value 1.97% higher, as shown in Table IV. The experimental values of the two methods were compared statistically by ANOVA showing non-significant difference ($P > 0.05$). The LOQ found by RP-LC method is forty times more sensitive than the MEKC method, but the proposed method can be useful for the determination of FP without prior separation of the excipients of the formulation, with advantages of small sample volumes, without consumption of organic solvents and short analysis time. The application for the analysis of spiked human plasma samples after extraction procedure (7) was also considered, but due to the very low levels of FP achieved, the more sensitive existing methods by mass spectrometry are useful.

Table IV. Comparison between MEKC and RP-LC methods applied for the analysis of fluticasone propionate (FP) in nasal sprays

Theoretical amount		Experimental amount					
		MEKC*			RP-LC*		
Sample	µg per dose	µg	%	RSD [†] (%)	µg	%	RSD [†] (%)
1	50	51.72	103.45	0.98	50.76	101.51	0.29
2	50	50.60	101.02	0.77	49.46	98.93	0.43
3	50	51.15	102.31	1.02	50.20	100.41	0.54
4	50	49.06	98.12	0.83	48.04	96.08	0.31

* Mean of three replicates.
[†] RSD = relative standard deviation.

Conclusion

The results of validation studies show that the MEKC method with a LOQ of 2 µg/mL, is accurate with a mean value of 100.37% and bias lower than 1.47%, economic, specific and stability-indicating. It possesses significant linearity ($r^2 = 0.9956$) and precision of the peak area ratio with a RSD of 0.84%, without any interference from the excipients or degradation products, as demonstrated also by MS studies. Therefore, the proposed method was successfully applied for the quantitative analysis of FP in pharmaceutical formulations of nasal sprays, representing an alternative for the quality control, and also contributing to assure the therapeutic efficacy of the drug.

Acknowledgements

The authors wish to thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, project 475062/2007-8), FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado

do Rio Grande do Sul, project 07517142) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the financial support.

References

1. P.J. Barnes, S. Pedersen, and W.W. Busse. Efficacy and safety of inhaled corticosteroids. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **157**: S1-53 (1998).
2. R. Dahl, L.P. Nielsen, J. Kips, A. Foresi, P. van Cauwenberge, N. Tudoric, P. Howarth, D.H. Richards, M. Williams, and R. Pauwels. Intranasal and inhaled fluticasone propionate for pollen-induced rhinitis and asthma. *Allergy* **60**: 875-81 (2005).
3. S.J. Szeffler. Pharmacokinetics of intranasal corticosteroids. *J. Allergy Clin. Immunol.* **108**: S26-31 (2001).
4. M. Frieri. Inflammatory issues in allergic rhinitis and asthma. *Allergy Asthma Proc.* **26**: 163-9 (2005).
5. B.M. Prenner, and E. Schenkel. Allergic rhinitis: treatment based on patient profiles. *Am. J. Med.* **119**: 230-37 (2006).
6. B.M. Bain, G. Harrison, K.D. Jenkins, A.J. Pateman, and E.V.B. Shenoy. A sensitive radioimmunoassay, incorporating solid-phase extraction, for fluticasone 17-propionate in plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **11**: 557-61 (1993).
7. Y.N. Li, B.N. Tattam, K.F. Brown, and J.P. Seale. A sensitive method for the quantification of fluticasone propionate in human plasma by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **16**: 447-52 (1997).

8. L. Laughler, T.G. Noctor, A. Barrow, J.M. Oxford, and T. Phillips. An improved method for the determination of fluticasone propionate in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **21**: 749-58 (1999).
9. S. Krishnaswami, H. Möllmann, H. Derendorf, and G. Hochhaus. A sensitive LC-MS/MS method for the quantification of fluticasone propionate in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **22**: 123-9 (2000).
10. S.L. Callejas, R.A. Biddlecombe, A.E. Jones, K.B. Joyce, A.I. Pereira, and S. Pleasance. Determination of the glucocorticoid fluticasone propionate in plasma by automated solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **718**: 243-50 (1998).
11. R.L. Taylor, S.K. Grebe, and R.J. Singh. Quantitative, highly sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of synthetic corticosteroids. *Clin. Chem.* **50**: 2345-52 (2004).
12. D. Murnane, G.P. Martin, and C. Marriot. Validation of a reverse-phase high performance liquid chromatographic method for concurrent assay of a weak base (salmeterol xinafoate) and a pharmacologically active steroid (fluticasone propionate) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **40**: 1149-54 (2006).
13. J.L. Bernal, M.J. Nozal, M.T. Martín, J.C. Diez-Masa, and A. Cifuentes. Quantitation of active ingredients and excipients in nasal sprays by high-performance liquid chromatography, capillary electrophoresis and UV spectroscopy *J. Chromatogr. A* **823**: 423-31 (1998).
14. M.S. Sangoi, D.R. Nogueira, L.M. Silva, D.P. Leal, S.L. Dalmora. Validation of a stability-indicating reversed-phase LC method for the determination of fluticasone

- propionate in pharmaceutical formulations. *J. Liq. Chrom. & Rel. Tech.* **31**: 2113-27 (2008).
15. K.D. Altria, and D. Elder. Overview of the status and applications of capillary electrophoresis to the analysis of small molecules. *J. Chromatogr. A* **1023**: 1-14 (2004).
16. T.G. Morzunova. Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis (a review). *Pharm. Chem. J.* **40**: 158-70 (2006).
17. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*, Geneva, 2005.
18. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use. *Stability Testing of New Drugs Substance and Products Q1A(R2)*, Geneva, 2003.
19. R. Injac, M. Boskovic, N. Kocevar, and T. Vovk. Comparative study of robustness between micellar electrokinetic capillary chromatography and high-performance liquid chromatography using one-variable-at-a-time and a new multi-variable-at-a-time approach. *Anal. Chim. Acta* **620**: 150-61 (2008).
20. B. Dejaegher, and Y. V. Heyden. Ruggedness and robustness testing. *J. Chromatogr. A* **1158**: 138-157 (2007).
21. K.M. Alsante, A. Ando, R. Brown, J. Ensing, T.D. Hatajik, W. Kong, and Y. Tsuda. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**: 29-37 (2007).

22. E. Rozet, A. Ceccato, C. Hubert, E. Ziemons, R. Oprean, S. Rudaz, B. Boulanger, and P. Hubert. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *J. Chromatogr. A* **1158**: 111-25 (2007).
23. G.A. Shabir, W.J. Lough, S.A. Arain, and T.K. Bradshaw. Evaluation and application of best practice in analytical method validation. *J. Liq. Chrom. & Rel. Tech.* **30**: 311-33 (2007).
24. Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice. J. Ermer and J.H.M. Miller, Eds. Wiley-VCH, Weinheim, 2005, pp. 101-19.
25. G.A. Shabir. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J. Chromatogr. A* **987**: 57-66 (2003).

DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

Os métodos analíticos são fundamentais para a identificação, quantificação, estudos de dissolução e análises de fármacos e produtos farmacêuticos, e de amostras em matrizes biológicas. Nesse contexto, observa-se que o propionato de fluticasona é um produto farmacêutico de lançamento relativamente recente no mercado brasileiro (2001), e encontram-se poucas publicações sobre métodos para sua análise quantitativa em formulações farmacêuticas.

Observa-se que a discussão apresentada a seguir baseia-se nos dois artigos, um já publicado e outro aceito, referenciados adequadamente, no texto correspondente.

A CL possibilita a separação e quantificação de diferentes componentes de uma formulação farmacêutica através da escolha adequada dos parâmetros do sistema como colunas, fase móvel e método de detecção. Desenvolveu-se e validou-se procedimento para a determinação de PF em formulações farmacêuticas, conforme demonstrado na **PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.1**. Na avaliação da especificidade obtiveram-se cromatogramas nos quais os picos dos produtos de degradação encontraram-se resolvidos em relação ao pico da solução padrão (Figura 2). Além disso, utilizando o detector de arranjo de diodos, verificou-se que a substância química de referência permaneceu com elevada pureza em todas as determinações, demonstrando a especificidade e que o procedimento também pode ser usado para avaliação da estabilidade. O método apresentou-se linear na faixa de 0,05-150 µg/mL ($r^2 = 0,9999$). Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária apresentaram coeficientes de variação inferiores a 0,68% (Tabela 1), o que mostra a precisão do método proposto, destacando-se que a literatura preconiza coeficiente de variação menor ou igual a 2,0%. O valor médio experimental do teste de exatidão foi de 99,36%, conforme Tabela 2, demonstrando exatidão significativa, pois o valor percentual sugerido é de $100 \pm 2\%$ em relação ao declarado (SHABIR, 2003). Na avaliação da robustez, observou-se que as variações na proporção de acetonitrila e metanol, na vazão e pH da fase móvel, e na temperatura da coluna alteraram os tempos de retenção. Os resultados obtidos na verificação da performance do sistema cromatográfico mostraram que o equipamento e condições da metodologia são adequados para assegurar a confiabilidade, exatidão e precisão dos dados analíticos ($CV < 2,0\%$). Demonstrando-se, portanto, que o método proposto cumpre os requisitos preconizados pela literatura em relação à validação, podendo ser empregado para análise de propionato de fluticasona em formulações farmacêuticas. A determinação

quantitativa dos sprays nasais e cremes selecionados para esse estudo forneceu resultados médios entre 95,96 e 106,50%, conforme a Tabela 4, com apenas uma amostra estando em desacordo com os parâmetros de qualidade preconizados entre 95 e 105% (USP 30, 2007; ICH, 2005, SHABIR, 2003). Por sua vez, comparado aos métodos farmacopeicos recentemente preconizados, observa-se que é mais sensível, apresenta menor tempo de análise e pode ser aplicado em estudos de estabilidade.

A cromatografia eletrocínética micelar foi desenvolvida para a resolução de compostos neutros, que não podem ser separados sem a utilização de surfactantes no eletrólito. As moléculas desse surfactante agregam-se, formando micelas de carga negativa. A partir de uma determinada concentração, a CMC, essas micelas englobam as moléculas neutras do analito e migram em direção ao detector. Esta técnica eletroforética apresenta alta precisão e exatidão, tempo de análise relativamente curto, tornando-se adequada para análise de fármacos em controle de qualidade. Para determinação do propionato de fluticasona em sprays nasais, desenvolveu-se e validou-se método por cromatografia eletrocínética micelar, utilizando acetato de prednisolona como padrão interno, conforme demonstrado na **PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.2**. Dados da literatura indicam que o método por EC é menos sensível que a CL devido, principalmente, ao baixo volume de injeção e a estreita faixa de análise do detector (WÄTZIG & GÜNTER, 2003). Porém, para o controle de qualidade, nem sempre se necessita de método altamente sensível como ocorre em análises bioanalíticas. A metodologia foi validada através da avaliação dos parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e detecção, robustez, estabilidade e adequabilidade do sistema. Pelos dados obtidos na especificidade do método, propõe-se que o método validado seja indicador de estabilidade, mesmo que nenhum pico adicional tenha sido encontrado, já que os excelentes valores de pureza dos picos avaliados comprovam que nenhum outro composto migrou no mesmo tempo de migração que o padrão e PI. Comparando-se os resultados obtidos com a análise da especificidade por CL-FR (PÚBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.1), na qual picos adicionais foram encontrados nas condições básica e fotolítica, conclui-se que os produtos de degradação formados ou não, migraram no método proposto, ou se presentes, não interferiram na especificidade do método. A linearidade foi determinada pela construção de três curvas analíticas na faixa de 2-80 µg/mL ($r^2 = 0,9956$). A precisão do método apresentou CV% inferior a 1,35% e o valor médio experimental obtido na exatidão foi de 100,37% com bias menor que 1,47%, indicando que o método é preciso e exato dentro da faixa esperada (Tabelas I e II). As condições experimentais aplicadas no teste de robustez junto com os parâmetros otimizados não

apresentaram alteração significativa nos tempos de migração do padrão e do PI (Tabela III), mostrando-se que o método é robusto nas condições analisadas. O teste de adequabilidade do sistema apresentou resultados satisfatórios indicando que o método é adequado para o objetivo proposto. Dessa forma, o método foi aplicado na análise de teor de propionato de fluticasona em spray nasal e os resultados avaliados foram comparados com aqueles obtidos na validação do método por CL-FR, com valor médio 1,97% maior (Tabela IV). Os valores experimentais dos dois métodos foram comparados estatisticamente por ANOVA observando-se que não há diferenças significativas dos resultados ($P > 0,05$). Além disso, determinou-se o coeficiente de correlação de Pearson obtendo um valor superior a 0,99. O método em CL-FR é mais sensível, porém o método proposto por EC pode ser uma alternativa para determinação de PF em amostras comerciais, com vantagens de pequenos volumes, sem consumo de solventes orgânicos e curto tempo de análise. O método também foi testado para análise em plasma humano, mas não se mostrou adequado devido aos baixos níveis farmacocinético analito. O método por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é 1 sensível e portanto mais adequado para este tipo de análise em matriz biológica.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

- ✓ Desenvolveu-se e validou-se método por cromatografia líquida em fase reversa que se mostrou específico, preciso, exato, sensível e robusto para análise de propionato de fluticasona em produtos farmacêuticos, sugerindo-se sua aplicação para a área de controle da qualidade de medicamentos.
- ✓ Desenvolveu-se e otimizou-se método por eletroforese capilar utilizando a técnica de cromatografia eletrocínética micelar para determinação de propionato de fluticasona em sprays nasais que foi validado, cumprindo os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez preconizados para métodos analíticos.
- ✓ Ambos os métodos foram aplicados para a separação cromatográfica e eletroforética dos produtos de degradação do propionato de fluticasona, demonstrando sua importância para estudos de estabilidade.
- ✓ Realizou-se a análise comparativa dos resultados dos métodos por cromatografia líquida em fase reversa e por cromatografia eletrocínética micelar pela ANOVA, demonstrando que não há diferença significativa ($P > 0,05$). Além disso, avaliaram-se os dados pelo coeficiente da correlação de Pearson obtendo-se valor superior a 0,99.
- ✓ Os métodos desenvolvidos e validados no presente trabalho estabelecem bases para progressivos trabalhos científicos na área e procedimentos importantes para aprimorar o controle da qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica dos produtos farmacêuticos disponíveis no País.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, D. B. Systemic effects of intranasal steroids: An endocrinologist's perspective. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 106, n. 4, p. S179-S190, 2000.

ALSANTE, K. M. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 29-37, 2007.

ALTRIA, K. D.; ELDER, D. Overview of the status and applications of capillary electrophoresis to the analysis of small molecules. **Journal of Chromatography A**, v. 1023, p. 1-14, 2004.

ALVARENGA, S. M.; GIORGI, R. D. N.; CHAHADE, W. H. Antiinflamatórios hormonais: Glicocorticóides. **Einstein**, v. 6, p. S159-S165, 2008.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. Brasília, Diário Oficial da União, 2003.

BAID, S. K.; NIEMAN, L. K. Therapeutic doses of glucocorticoids: Implications for oral medicine. **Oral Diseases**, v. 12, p. 436-442, 2006.

BAIN, B. M. *et al.* A sensitive radioimmunoassay, incorporating solid-phase extraction, for fluticasone 17-propionate in plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 11, p. 557-561, 1993.

BARNES, P. J.; PEDERSEN, S.; BUSSE, W. W. Efficacy and safety of inhaled corticosteroids: new developments. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 157, p. S1-S53, 1998.

BERNAL, J. L. *et al.* Quantitation of active ingredients and excipients in nasal sprays by high-performance liquid chromatography, capillary electrophoresis and UV spectroscopy. **Journal of Chromatography A**, v. 823, p. 423-431, 1998.

BOETTGER, M. K. *et al.* Increased vagal modulation in atopic dermatitis. **Journal of Dermatological Science**, v. 53, p. 55-59, 2009.

BRITISH PHARMACOPOEIA (BP). Her Majesty's Stationary Office, London, V. I, 2007.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11^a ed. Rio de Janeiro-RJ: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006.

CALLEJAS, S. L. *et al.* Determination of the glucocorticoid fluticasone propionate in plasma by automated solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 718, p. 243-250, 1998.

CARTER, S. J.; ČÁPKA, V. Investigation of interaction between salmeterol and fluticasone propionate and its effect on quantitative accuracy of an LC/MS/MS assay in human plasma at low pg/mL concentrations. **Journal of Chromatography B**, v. 876, p. 163-169, 2008.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP: Ed. da UNICAMP, 2006.

CORREN, J. Allergic rhinitis: Treating the adult. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 105, n. 6, p. S610-S615, 2000.

DAHL, R. *et al.* Intranasal and inhaled fluticasone propionate for pollen-induced rhinitis and asthma. **Allergy**, v. 60, p. 875-881, 2005.

DALEY-YATES, P. T. *et al.* Bioavailability of fluticasone propionate and mometasone furoate aqueous nasal sprays. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 60, p. 265-268, 2004.

DAVIES, N. M.; FEDDAH, M. R. A novel method for assessing dissolution of aerosol inhaler products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 255, p. 175-187, 2003.

DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y. V. Ruggedness and robustness testing. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 138-157, 2007.

De KLOET, E. R. *et al.* Brain mineralocorticoid receptor diversity: functional implications. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 47, p. 189-190, 1993.

DEMOLY, P. Safety of intranasal corticosteroids in acute rhinosinusitis. **American Journal of Otolaryngology-Head and Neck Medicine and Surgery**, v. 29, p. 403-413, 2008.

DERENDORF, H. *et al.* Systemic bioavailability of inhaled steroids: the importance of appropriate and comparable methodology. **European Respiratory Journal**, v. 17, p. 157-158, 2001.

DERENDORF, H.; MELTZER, E. O. Molecular and clinical pharmacology of intranasal corticosteroids: Clinical and therapeutic implications. **Allergy**, v. 63, p. 1292-1300, 2008.

EDSBÄCKER, S.; JOHANSSON, C.-J. Airway selectivity: An update of pharmacokinetic factors affecting local and systemic disposition of inhaled steroids. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 98, p. 523-536, 2006.

EICHENFIELD, L. F.; MILLER, B. H. Two randomized, double-blind, placebo-controlled studies of fluticasone propionate lotion 0.05% for the treatment of atopic dermatitis in subjects from 3 months of age. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, n. 4, 2006.

ERMER, J.; MILLER, J. H. M. **Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice**. Weinheim: Wiley-VCH, 2005, p. 101-119.

FDA - Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, **Guidance for Industry: Bioavailability and bioequivalence studies for nasal aerosols and nasal sprays for local action**, April 2003.

FORNADLEY, J. A. *et al.* Allergic rhinitis: Clinical practice guideline. **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 115, n. 1, p. 115-122, 1996.

FOWLER, P. D. *et al.* A randomized double-blind study to compare the effects of nasal fluticasone and betamethasone on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and bone turnover in patients with nasal polyposis. **Clinical Otolaryngology**, v. 27, p. 489-493, 2002.

FULLER, R.; JOHNSON, M.; BYE, A. fluticasone propionate – an update on preclinical and clinical experience. **Respiratory Medicine**, v. 89A, p. 3-18, 1995.

FRIERI, M. Inflammatory issues in allergic rhinitis and asthma. **Allergy and Asthma Proceedings**, v. 26, p. 163-169, 2005.

GOYAL, N.; HOCHHAUS, G. Fluticasone furoate nasal spray in allergic rhinitis. **Drugs of Today**, v. 44, n. 4, p. 251-260, 2008.

GUO, C.; DOUB, W. H. The influence of actuation parameters on in vitro testing of nasal spray products. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 9, p. 2029-2040, 2006.

HEBERT, A. A.; FRIEDLANDER, S. F.; ALLEN, D. B. Topical fluticasone propionate lotion does not cause HPA axis suppression. **The Journal of Pediatrics**, v. 149, p. 378-382, 2006.

HEPBURN, D.; YOHN, J. J.; WESTON, W. L. Topical steroid treatment in infants, children and adolescents. **Advances in Dermatology**, v. 9, p. 225-255, 1994.

HOCHHAUS, G. Relative receptor affinity comparisons among inhaled/intranasal corticosteroids: Perspectives on clinical relevance. **Respiratory Research**, v. 9, n. 75, p. 1-2, 2008.

HOLLAND, L. A. *et al.*, 1997. Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 4, p. 372-387, 1997.

ICH - **International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use**: Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2), 2003.

ICH - **International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use**: Guideline on validation of analytical procedure: Text and Methodology Q2(R1), 2005.

ICH - **International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use**: Guideline on impurities in new drug substances Q3A(R2), 2006.

INJAC, R. *et al.* Comparative study of robustness between micellar electrokinetic capillary chromatography and high-performance liquid chromatography using one-variable-at-a-time and a new multi-variable-at-a-time approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 620, p. 150-161, 2008.

ISAKSSON, M. Corticosteroids. **Dermatologic Therapy**, v. 17, p. 314-320, 2004.

JAAN TAI, C.; WANG, P.-C. Comparisons of two intranasal corticosteroid preparations in treating allergic rhinitis. **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 129, n. 5, p. 518-525, 2003.

JOHNSON, M. Development of fluticasone propionate and comparison with other inhaled corticosteroids. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 101, n. 4, p. S434-S439, 1998.

KAISER, H. B. *et al.* Fluticasone furoate nasal spray: A single treatment option for the symptoms of seasonal allergic rhinitis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, n. 6, p. 1430-1437, 2007.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **HPLC for Pharmaceutical Scientists**. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, 2007.

KOWALSKI, P. *et al.* Comparative evaluation between capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography for the analysis of florfenicol in plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 5, p. 983-989, 2005.

KRAKOWSKI, A. C.; DOHIL, M. A. Topical therapy in pediatric atopic dermatitis. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 27, p. 161-167, 2008.

KRISHNASWAMI, S. *et al.* A sensitive LC-MS/MS method for the quantification of fluticasone propionate in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 22, p. 123-129, 2000.

KROUSE, J. H. Allergic rhinitis-current pharmacotherapy. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v. 41, p. 347-358, 2008.

LANE, A. T. Efficacy and safety of topical steroids in paediatric atopic dermatitis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venerology**, v. 8, p. S24-S27, 1997.

LANDERS, J. P. **Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques**. 3th ed. Boca Ratom, FL: Taylor & Francis Group, 2008.

LAUGHER, L. *et al.* An improved method for the determination of fluticasone propionate in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 21, p. 749-758, 1999.

LEE, N. P; ARRIOLA, E. R. How to treat allergic rhinitis. **Best Practice**, v. 171, p. 31-34, 1999.

LI, Y. N. B. *et al.* A sensitive method for the quantification of fluticasone propionate in human plasma by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 16, p. 447-452, 1997.

MASCHER, H. J.; ZECH, K.; MASCHER, D. G. Sensitive simultaneous determination of ciclesonide, ciclesonide-M1-metabolite and fluticasone propionate in human serum by HPLC-MS/MS with APPI. **Journal of Chromatography B**, v. 869, p. 84-92, 2008.

MORZUNOVA, T. G. Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis (a review). **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 40, p. 158-170, 2006.

MURNANE, D.; MARTIN, G. P.; MARRIOTT, C. Validation of a reverse-phase high performance liquid chromatographic method for concurrent assay of a weak base (salmeterol xinafoate) and a pharmacologically active steroid (fluticasone propionate). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 1149-1154, 2006.

MYGIND, N. *et al.* Mode of action of intranasal corticosteroids. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, n. 1, p. S16-S25, 2001.

OKUBO, K. *et al.* Comparison of fluticasone furoate and fluticasone propionate for the treatment of Japanese cedar pollinosis. **Allergy and Asthma Proceedings**, *in press*.

PRENNER, B. M.; SCHENKEL, E. Allergic rhinitis: Treatment based on patient profiles. **The American Journal of Medicine**, v. 119, p. 230-237, 2006.

RAO, R. N.; NAGARAJU, V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, p. 335-1040, 2003.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory action of glucocorticoids - New mechanisms for old drugs. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1711-1723, 2005.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROHATAGI, S. *et al.* Risk-benefit value of inhaled glucocorticoids: A pharmacokinetic/pharmacodynamic perspective. **Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**, v. 44, p. 37-47, 2004.

ROUMESTAN, C. *et al.* Fluticasone propionate and mometasone furoate have equivalent transcriptional potencies. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 33, p. 895-901, 2003.

ROZET, E. *et al.* Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 111-125, 2007.

SCADDING, G. K. Corticosteroids in the treatment of pediatric allergic rhinitis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, n. 1, p. S59-S64, 2001.

SCADDING, G. K. Allergic rhinitis in children. **Paediatrics and Child Health**, v. 18, n. 7, p. 323-328, 2008.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57-66, 2003.

SHABIR, G. A. *et al.* Evaluation and application of best practice in analytical method validation. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, p. 311-333, 2007.

SONG, I. H.; GOLD, R.; STRAUB, R. H. New glucocorticoids on the horizon: repress, don't active! **The Journal of Rheumatology**, v. 32, n. 6, p. 1199-1207, 2005

SPENCER, C. M.; WISEMAN, L. R. Topical fluticasone propionate. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in the treatment of dermatological disorders. **Biodrugs**, v. 4, p. 318-334, 1997.

SUMAN, J. D. *et al.* Validity of in vitro tests on aqueous spray pumps as surrogates for nasal deposition. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 1, p. 1-6, 2002.

SZEFLER, S. J. Pharmacokinetics of intranasal corticosteroids. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, n. 1, p. S26-S31, 2001.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

TAYLOR, R. L.; GREBE, S. K.; SINGH, R. J. Quantitative, highly sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for detection of synthetic corticosteroids. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 2345-2352, 2004.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, The (USP) 30 ed. Rockville, United States Convention, 2007.

WALLACE, D. V. *et al.* The diagnosis and management of rhinitis: An updated practice parameter. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 122, p. S1-S84, 2008.

WANG, H. *et al.* **In vitro Bioequivalence Testing**. Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2003, p. 449-455.

WÄTZIG, H.; GÜNTER, S. Capillary electrophoresis – A high performance analytical separation technique. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 46, n. 6, p. 724-738, 2003.