

Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos

Validación de los métodos analíticos para el control de la calidad y estudio de estabilidad del salbutamol 0,5 % en solución nebulizadora

Caridad Margarita Garcia Peña,¹ Dianelys Fernández Mena,¹ Leopoldo Nuñez de la Fuente,² Martha Gómez Carril³ y Vivian Martínez Espinosa⁴

Resumen

Se validaron 2 métodos analíticos por espectrofotometría y por cromatografía líquida de alta resolución para el control de la calidad y el estudio de estabilidad, respectivamente, en la solución nebulizadora de salbutamol 0,5 %. En la validación se evaluaron los parámetros de especificidad para estos fines, linealidad del sistema, exactitud y precisión expresada en sus 2 formas: repetibilidad y precisión intermedia. Los métodos analíticos resultaron ser específicos, lineales, precisos, exactos en el intervalo de concentraciones estudiadas.

Palabras clave: salbutamol, espectrofotometría, cromatografía líquida de alta resolución, control de la calidad, estudio de estabilidad.

El salbutamol es un estimulante beta 2 adrenérgico que posee una acción selectiva sobre estos receptores en el músculo liso bronquial y a dosis terapéuticas con acción limitada o ninguna sobre los receptores cardíacos. El salbutamol en forma de solución nebulizadora puede usarse conjuntamente con una ventilación intermitente de presión positiva, por lo general con una atmósfera enriquecida con oxígeno, para el tratamiento de los estados asmáticos (leves, moderados o severos) y otras formas agudas de espasmos bronquiales, cuando se hace necesaria una ventilación intermitente de presión positiva, como por ejemplo, exacerbaciones agudas de la bronquitis crónica y bronquiectasias.^{1,2}

La validación es el proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas de que el método es lo suficientemente fiable para producir el resultado.^{3,4}

El desarrollo de técnicas o métodos analíticos novedosos o la adecuación de algunos ya reportados es un problema cotidiano. Siempre que esto suceda se exige como parte integral del estudio, la validación del método en cuestión. La validación proporciona un alto grado de confianza y seguridad del proceso productivo o del método analítico, así como también en la calidad de los resultados.⁵

Los parámetros analíticos que pueden ser considerados en la validación de un método analítico, según se expresa en la USP 26, son exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango, tolerancia y robustez.^{6.7}

El objetivo de este trabajo fue la validación de los métodos analíticos para el control de la calidad y estudio de estabilidad en la solución.

Métodos

Desarrollo de método por espectrofotometría

El método por espectrofotometría visible para cuantificar el salbutamol en el control de la calidad de la solución nebulizadora, se basa en la reacción colorimétrica del complejo formado por el 4-aminofenazona en medio básico con la utilización de ferricianuro de potasio como agente oxidante que presenta un máximo de absorbancia a 550 nm (Técnica desarrollada en la UCTB. Tecnologías Complejas del CIDEM).

Para el análisis se disolvió una cantidad exacta del estándar de referencia en agua, de modo que se obtuviera una solución con una concentración final de 0,2 mg/mL. Las muestras fueron preparadas de forma similar.

Procedimiento: Pipetear 5 mL de cada solución y trasvasar a un matraz aforado de 50 mL, añadir 35 mL de solución tampón de trishidroximetilaminometano (36,5 g en 1 L de agua) a pH 9,5; 1 mL de solución de 4-aminofenazona al 2 % y 1 mL de ferricinauro de potasio al 8 %. Agitar vigorosamente, llevar a volumen con solución tampón, homogenizar. Realizar un ensayo en blanco con 5 mL de agua. Leer a los 75 s de haber añadido la solución de ferricianuro de potasio a una longitud de onda de 550 nm.

En el ensayo se empleó un espectrofotómetro SPECTRONIC GENESYS 2PC UV/VIS.

Validación del método por espectrofotometría

Con el objetivo de evaluar la especificidad del método se prepararon muestras de sustancia de referencia química, placebo y muestra de salbutamol solución nebulizadora; los espectros de las soluciones se registraron entre 400 y 700 nm.

Para el estudio de la linealidad de la respuesta del detector se preparó una curva de calibración con solución patrón de salbutamol que representa del 50 al 150 % de la concentración teórica del principio activo en la solución.

Se evaluó la precisión del método. La repetibilidad se estudió sobre la base de 5 determinaciones y se

efectuaron valoraciones por 2 analistas en 2 días diferentes para comprobar la precisión intermedia del método.

En el estudio de la exactitud y linealidad del método se empleó el método de recuperación; se prepararon muestras con diferentes niveles de la concentración teórica del principio activo en la solución bajo, medio y alto.

Todos los resultados obtenidos fueron evaluados estadísticamente con la ayuda del programa Microcal Origin 5.0 para Windows.

Desarrollo del método por cromatografía líquida de alta resolución

El método por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) para cuantificar el salbutamol en el estudio de estabilidad de la solución nebulizadora, se basa en la separación de este en una columna cromatográfica con detección ultravioleta y la cuantificación de esta frente a una muestra de referencia con el empleo del método del patrón externo.

En el ensayo se empleó un cromatógrafo (KNAUER) con detector UV/VIS (KNAUER) ajustado a 276 nm, un dosificador (Loop) de 20 μ L e integrador (SHIMADZU CR 8 A). La separación se realizó isocráticamente sobre una columna Lichrospher 250 x 4 m, RP 18, 5 μ m. La fase móvil utilizada consistió en una mezcla desgasificada de 2 componentes, *buffer* par iónico (3,15 g de fosfato de amonio en un matraz aforado de 1 000 mL en agua y se ajusta con ácido acético a pH 3 y se adiciona 5,49 g de hexanosulfonato de sodio, se diluye en agua y posteriormente se completa volumen):acetonitrilo de proporción (80:20) con una velocidad de flujo de 2,0 mL/min.

Para el análisis se disolvió una cantidad exacta del estándar de referencia en agua de modo que se obtuviera una solución con una concentración final de 50 μ g/mL. Las muestras fueron preparadas de forma similar.

Validación del método por cromatografía de alta resolución

Con el objetivo de evaluar la especificidad del método se analizó la sustancia de referencia química, el placebo y una muestra sometida a condiciones drásticas como: hidrólisis ácida HCl 3 N, hidrólisis básica NaOH 3 N, oxidación H₂O₂, durante 7 días.⁸

Para el estudio de la linealidad de la respuesta del detector se preparó una curva de calibración con soluciones patrón de salbutamol que representan del 50 al 150 % de la concentración teórica del principio activo en la solución.

Se evaluó la precisión del método. La repetibilidad se estudió sobre la base de 6 determinaciones y se

efectuaron valoraciones por 2 analistas en 2 días diferentes para comprobar la precisión intermedia del método.⁸

En el estudio de la exactitud y linealidad del método se empleó el método de recuperación; se prepararon muestras con diferentes niveles de salbutamol que representaban el 80, 100 y 120 % de la concentración teórica del principio activo en la solución, según la formulación propuesta.

Resultados

Validación por espectrofotometría

El resultado obtenido en el estudio de especificidad del método no se observa absorción a la longitud de onda donde se lee.

La ecuación de la recta de la curva de calibración presenta coeficiente de correlación lineal de 0,99793. Cuando se aplicó la prueba de linealidad mediante el coeficiente de variación de los factores de respuesta (CV_f) se obtuvo como resultado un coeficiente de variación CV_f igual a 1,8 %. Al aplicar la prueba de proporcionalidad se obtuvo una $t_{cal}= 1,68$ para una $t_{tab}= 3,18$.

El resultado del estudio de precisión aparece reportado en la tabla 1.

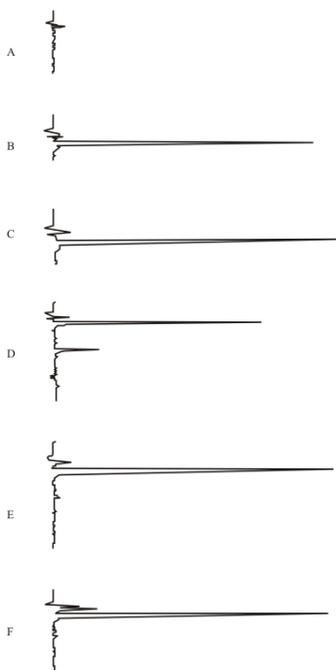
TABLA 1. Estudio de la precisión del método analítico por UV

Analista 1		Analista 2	
Día 1 (%)	Día 2 (%)	Día 1 (%)	Día 2 (%)
98,88	97,42	100,21	98,12
100,41	98,93	99,82	99,33
99,32	99,31	98,72	100,02
98,21	96,52	99,71	99,77
99,10	99,91	97,99	97,17

En la curva de recuperación, se reportan los miligramos teóricos contra los miligramos prácticos, y se obtiene la ecuación de la recta: $Y = 1,0035 X - 1,6$, con un coeficiente de correlación de 0,99993. Al realizar la prueba de significación entre la recuperación media y el 100 % de recuperación, se obtuvo una $t_{cal} = 1,32$ para una $t_{tab} = 3,18$ y un factor concentración $G_{exp} = 0,52$ y $G_{tab} = 0,68$.

Validación por cromatografía líquida de alta resolución

La figura muestra los resultados obtenidos en el estudio de especificidad del método. Como se observa en el cromatograma correspondiente a la muestra placebo (A) no se obtuvo ninguna señal en la zona de interés, al ser comparado con la señal obtenida para la solución estándar de referencia (B) y de la muestra de salbutamol en la solución nebulizadora (C), lo cual indica que los excipientes o sustancias auxiliares de la solución no interfieren en la determinación del principio activo. En cuanto a las muestras sometidas a condiciones drásticas de hidrólisis básica, hidrólisis básica y oxidación se observan en los cromatogramas (D, E, F) la aparición de picos secundarios, atribuible a un posible producto de degradación, el cual no interfiere en la determinación del principio activo.



A: cromatograma de la muestra placebo; B: cromatograma de la solución estándar de referencia; C: cromatograma de la muestra de salbutamol en la solución nebulizadora; D: cromatograma de la muestra sometida a hidrólisis ácida; E: cromatograma de la muestra sometida a hidrólisis básica; F: cromatograma de la muestra a oxidación.

FIG. Resultados del estudio de especificidad del método.

La ecuación de la recta de la curva de calibración en el rango de concentraciones estudiadas, se expresa según $y = 6466,80611 X - 15228,30995$, con un coeficiente de correlación lineal de 0,99829. Al aplicar la prueba de significación del intercepto se obtuvo una $t_{cal} = 2,11$ para una $t_{tab} = 3,18$. Cuando se aplicó la

prueba de linealidad mediante los coeficientes de variación de los factores de respuesta CV_f se obtuvo como resultado un coeficiente de variación $CV = 1,05 \%$.

Los resultados del estudio de la precisión aparecen en la tabla 2.

TABLA 2. Estudio de la precisión del método analítico por HPLC

Analista 1		Analista 2	
Día 1 (%)	Día 2 (%)	Día 1 (%)	Día 2 (%)
99,73	99,44	99,99	98,92
100,03	99,70	98,79	100,07
100,24	100,86	101,22	101,00
98,72	99,57	99,66	99,03
100,38	99,28	99,81	99,13
100,90	100,16	100,53	101,84

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos en el estudio de la exactitud del método. En la curva de recuperación, se reportan los miligramos teóricos contra los miligramos prácticos, para un coeficiente de correlación de 0,99824.

TABLA 3. Resultados de estudio de exactitud

Concentración teórica	Concentración real			R	S ²
20,0	20,72	20,13	19,96	20,0	20,72
22,5	23,07	22,23	22,48	22,5	23,07

25,0	25,48	24,61	24,89	25,0	25,48
------	-------	-------	-------	------	-------

Al aplicar la prueba de significación para conocer la influencia de la concentración (G de Cochran), se obtuvo una $G_{cal} = 0,2935$ para una $G_{tab} = 0,5441$.

Al realizar la prueba de significación entre la recuperación media y el 100 % de recuperación, se obtuvo una $t_{cal} = 0,0957$ para una $t_{tab} = 2,064$.

Discusión

Validación por espectrofotometría

El resultado obtenido del análisis de la muestra placebo, la solución de referencia y la muestra del producto terminado indica que los excipientes o sustancias auxiliares de la solución no interfieren en la determinación del principio activo; con estos resultados se demuestra la especificidad del método al no observarse absorbancia del placebo a la longitud de onda máxima del principio activo.

La curva de calibración resultó ser lineal.

Al aplicar la prueba del intercepto, este resultó ser no significativo ya que la t_{calc} fue menor que la t_{tab} . En la prueba de linealidad mediante el coeficiente de variación de los factores de respuesta CV_f se obtuvo un coeficiente de variación menor del 5 %, lo que demuestra la adecuada linealidad de acuerdo con el límite establecido, por lo que se cumple la linealidad en el intervalo de concentración estudiado.

En el estudio de la repetibilidad se alcanzó un coeficiente de variación adecuado lo que asegura la buena precisión del método según el límite para los métodos espectrofotométricos $CV \leq 1,5$ %. Los valores obtenidos para el estudio de la precisión intermedia demuestran que no existen diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por los analistas en diferentes días, para una probabilidad de 0,05 % ya que el valor de F_{calc} es menor que la F_{tab} . Al realizar la prueba de la t de Student el valor calculado resultó ser menor que el tabulado, por lo que no existen diferencias significativas entre las medias alcanzadas con un nivel de significación del 5 %.

En el rango seleccionado en el estudio de exactitud, los valores de porcentaje de recobro estuvieron dentro de los límites establecidos para los métodos espectrofotométricos (98-102 %) y los valores del coeficiente de variación para cada uno de los niveles de concentración estudiados resultaron ser menor que el 5 %. En la influencia del factor concentración sobre la variabilidad de los resultados de la exactitud al aplicar la prueba de Cochran se obtuvo que G_{exp} fue menor que la G_{tab} ; por tanto, las

varianzas de las concentraciones empleadas son equivalentes e indican que la concentración no influye en la variabilidad de estos. No existen diferencias significativas entre las recuperaciones medias y el 100 % de recuperación al aplicar la prueba de la t de Student, ya que la t_{calc} fue menor que la t_{tab} , por lo que el método es exacto. La curva de recuperación reportada de miligramos teóricos contra los miligramos prácticos demostró un comportamiento lineal. La prueba de significación del intercepto resultó no significativa y el valor de la pendiente no difiere significativamente de la unidad. Los valores alcanzados de la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación demostraron la exactitud y linealidad del método.

Validación por cromatografía líquida de alta resolución

Los resultados obtenidos del análisis de la muestra placebo, la solución de referencia, la muestra del producto terminado y la muestra degradada por hidrólisis ácida HCl 3 N, hidrólisis básica NaOH 3 N y oxidación H_2O_2 durante 7 días (fig.), demuestran la especificidad del método al no presentarse interferencias de picos adicionales en la zona de elución del producto principal.

La curva de calibración resultó ser lineal en un rango de concentraciones estudiadas.

Al aplicar la prueba del intercepto, este resultó ser no significativo ya que la t_{calc} fue menor que la t_{tab} . En la prueba de linealidad mediante los coeficientes de variación de los factores de respuesta CV_f se obtuvo un coeficiente de variación menor del 5 %, lo que manifiesta la adecuada linealidad de acuerdo con el límite establecido, por lo que se demuestra el cumplimiento de la linealidad en el intervalo de concentración estudiado.

En el estudio de la repetibilidad se alcanzó un coeficiente de variación adecuado, lo que indica la buena precisión del método según el límite para los métodos cromatográficos ($\text{CV} \leq 2 \%$). Los valores obtenidos para el estudio de la precisión intermedia demuestran que no existen diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por los analistas en diferentes días para una probabilidad del 0,05 % ya que el valor de F_{calc} es menor que la F_{tab} . Al realizar la prueba de la t de Student el valor calculado resultó ser menor que el tabulado para una probabilidad de 0,05, por lo que no existen diferencias significativas entre las medias alcanzadas con un nivel de significación del 5 %.

En el rango seleccionado en el estudio de exactitud, los valores de porcentaje de recobro estuvieron dentro de los límites establecidos para los métodos cromatográficos (98-102 %) y los valores del coeficiente de variación para cada uno de los niveles de concentración estudiados resultaron ser menor que el 2 %.

En la influencia del factor concentración sobre la variabilidad de los resultados de la exactitud al aplicar la prueba de Cochran se obtuvo que G_{exp} fue menor que la G_{tab} para una probabilidad de 0,05, $k= 3$ y $n= 3$; por tanto, las varianzas de las concentraciones empleadas son equivalentes e indican que la

concentración no influye en la variabilidad de estos.

No existen diferencias significativas entre la recuperación media (100,008 %) y el 100 % de recuperación al aplicar la prueba de la t de Student, ya que la t_{calc} fue menor que la t_{tab} para n-1 grados de libertad y una probabilidad de 0,05, por lo que el método es exacto.

La curva de recuperación reportada de miligramos teóricos contra los miligramos prácticos demostró un comportamiento lineal.

La prueba de significación del intercepto resultó no significativa y el valor de la pendiente no difiere significativamente de la unidad.

Los valores alcanzados de la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación demostraron la exactitud y linealidad del método.

En conclusión, los métodos analíticos desarrollados para el control de la calidad y el estudio de estabilidad de la solución nebulizadora de salbutamol 0,5 % resultaron ser lineales, precisos, exactos y específicos en el intervalo de concentraciones estudiadas.

Summary

Validation of the analytical methods for the quality control and stability study of salbutamol 0.5 % in nebulizing solution

Two analytical methods were validated by spectrophotometry and high performance liquid chromatography for the quality control and the stability study, respectively, in the nebulizing solution of salbutamol 0.5 %. In the validation, there were evaluated the specificity parameters for these ends, lineality system, exactness and accuracy, which was expressed in its 2 ways: repeatability and intermediate precision. The analytical methods proved to be specific, lineal, accurate and exact in the interval of studied concentrations.

Key words: Salbutamol, spectrophotometry, high performance liquid chromatography, quality control, stability study.

Referencias Bibliográficas

1. Martindale W. The extra pharmacopoeia. 28th ed. London: Pharmaceutical Press; 1989. p. 1234-5.
2. Goodman A, Gilman, A. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Tomo III. La Habana: Edición Científico Técnica; 1994. p. 851. (Edición Revolucionaria).

3. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Validación de Métodos Analíticos. Sección Catalana de AEFI. Comisión de normas de buena fabricación y control de la calidad. Sept, 1989. p. 1-94.
4. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Methodology, ICH-Q2B, Geneva, 1996. ICH harmonized tripartite guideline. Methodology of validation of analytical method. Recomendado en nov. 1996.
5. Farmacopea Británica. 2000. p. 2218-20.
6. United States Pharmacopoeial Convention, USP 23-NF 17. Validation of Compendial Methods. 23 ed. Rockville: Mack Printing; 1995. p. 1982-4.
7. United States Pharmacopoeial Convention, INC. Validation of Compendial Methods. Rockville: Mack Printing; 2000.
8. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of analytical procedures, ICH-Q2A, Geneva, 1995.

Recibido: 7 de febrero de 2005. Aprobado: 10 de marzo de 2005.

Lic. *Caridad Margarita García Peña*. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. Ave. 26 No. 1605 entre Boyeros y Puentes Grandes, CP 10600, municipio Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, Cuba.

1

Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Investigadora Aspirante.

2

Master en Ciencias Técnicas. Investigador Aspirante.

3

Master en Ciencias en Tecnología y Control de los Medicamentos. Investigadora Auxiliar.

4

Técnica en Tecnología Farmacéutica.