

Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos

Validación de los métodos analíticos para el control de la calidad y el estudio de estabilidad del colirio de idoxiuridina 0,1 %

Caridad Margarita García Peña¹ y Vivian Martínez Espinosa²

Resumen

Se validaron 2 métodos analíticos por espectrofotometría ultravioleta y por cromatografía líquida de alta resolución para el control de la calidad y el estudio de estabilidad, respectivamente, en el colirio de idoxiuridina 0,1 %. 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: Idoxiuridina, espectrofotometría ultravioleta, cromatografía líquida de alta resolución, control de la calidad, estudio de estabilidad.

La idoxiuridina es un agente antiviral que actúa mediante la inhibición del ácido desoxirribonucleico de los virus, tales como: adenovirus, citomegalovirus y vaccinia. Comercialmente existen 3 formas farmacéuticas de presentación: colirio, ungüento y jalea indicadas en el tratamiento de infecciones virales del órgano ocular, dérmicas y estomatológicas.^{1,2}

La USP 26 reporta para este medicamento un método por cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de la idoxiuridina, donde se utiliza una columna RP-18 y detección ultravioleta a una longitud de onda fija de 254 nm, utilizado en el estudio de estabilidad del producto por ser el capaz de determinar el principio activo en presencia de los productos de degradación.³ Como el método analítico reportado es muy costoso, se desarrolla un método analítico espectrofotométrico para el control de la calidad del producto terminado por ser sencillo, económico y rápido.

El desarrollo de técnicas o métodos analíticos 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.⁴

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.^{5,6}

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

Métodos

La sustancia de referencia de idoxiuridina fue suministrada por el área de Materiales de Referencia Química del Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). El producto terminado en forma de colirio, fue elaborado en la Empresa Farmacéutica “Julio Trigo”.

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad puro para análisis.

En el desarrollo del método analítico por espectrofotometría ultravioleta se utilizó un espectrofotómetro Spectronic[®] Génesis™ 2PC. Para la selección adecuada de la longitud de onda a utilizar, se realizaron previamente espectros, en la zona de 200 a 400 nm, de sustancia de referencia, materia prima de idoxiuridina, producto terminado y placebo, disueltos en hidróxido de sodio 0,01 N; se observó un máximo de absorbancia a 278 nm.

La solución de referencia se obtiene disolviendo idoxiuridina sustancia de referencia en hidróxido de sodio 0,01 N hasta obtener una concentración de 40 µg/mL aproximadamente.

En la preparación de la solución de ensayo para la valoración se disuelve una alícuota de la muestra del colirio en hidróxido de sodio 0,01 N hasta una concentración de alrededor de 40 µg/mL. Se lee a 278 nm contra un blanco de hidróxido de sodio 0,01 N.

Con el objetivo de evaluar la especificidad del método se prepararon muestras de sustancia de referencia química, placebo, muestra de idoxiuridina colirio, muestras sometidas a condiciones drásticas, y se realizó un scanning de las soluciones entre 200 y 400 nm.

Para el estudio de la linealidad de la respuesta del detector se preparó una curva de calibración con solución patrón de idoxiuridina que representa del 60 al 140 % de la concentración teórica del principio activo en el colirio.

Se realizó el cálculo de la precisión del método expresada en sus 2 formas: repetibilidad y precisión intermedia. La repetibilidad se realizó sobre la base de 6 determinaciones y se estudió la precisión intermedia mediante las valoraciones por 2 analistas y en diferentes días.

Con el objetivo de determinar si existen diferencias significativas entre los resultados analíticos obtenidos por el método desarrollado y el método reportado, se realizó un estudio estadístico.

Para el estudio de la exactitud se empleó el método de recuperación, se prepararon muestras placebos por triplicado, adicionando a estas concentraciones conocidas de idoxiuridina que correspondían al 80, 100 y 120 % de lo declarado de principio activo.

Se determinó también para el ensayo de exactitud, la influencia del factor concentración en los resultados, mediante la prueba de G de Cochran.

El método por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) para cuantificar la idoxiuridina en el estudio de estabilidad del colirio, 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 mediante el método del patrón externo.

En el ensayo se empleó un cromatógrafo (KNAUER) con detector UV/VIS (KNAUER) ajustado a 254 nm, un dosificador (Loop) de 20 µL e integrador (SHIMADZU CR 8 A). La separación se realizó isocráticamente sobre una columna Lichrospher 250 x 4 m, RP 18, 5 µm. La fase móvil utilizada consistió en una mezcla desgasificada de 2 componentes, metanol:agua de proporción (13:87) con una velocidad de flujo de 1,7 mL/min.⁷

Para el análisis se disolvió una cantidad exacta del estándar de referencia de modo que se obtuviera una solución

con una concentración final de 400 µg/mL. Las muestras fueron preparadas de forma similar.

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

Para el estudio de la linealidad de la respuesta del detector se preparó una curva de calibración con soluciones patrón de idoxiuridina que representan del 60 al 140 % de la concentración teórica del principio activo en el colirio.

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.

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

Resultados

Validación del método para el control de la calidad

En el resultado obtenido del estudio de especificidad del método no se observa absorción a la longitud de onda donde se lee la muestra, el placebo y la sustancia de referencia química. Sin embargo, se observa absorción a la longitud de onda donde leen las muestras sometidas a condiciones drásticas.

En la tabla 1 se reportan los resultados del estudio de la linealidad del sistema.

TABLA 1. Estudio de la linealidad del sistema

| Parámetros | Resultados | | Límites |
|----------------------------|--|---|---------------------------------------|
| | UV | HPLC | |
| Ecuación de la recta | $y = 0,06128 + 5,54326 \text{ E-}5 x$ $r = 0,99908$ | $y = 0,02412 x + 1,10614 \text{ E-}7$ $r = 0,99813$ | $y = a x + b$ $r \geq 0,99000$ |
| Prueba de linealidad | $CV_f = 1,71 \%$ | $CV_f = 2,44 \%$ | $CV_f < 5,0 \%$ |
| Prueba de proporcionalidad | $t_{\text{calc}} = 1,28$ $t_{\text{tab}} = 3,18$ | $t_{\text{calc}} = 2,70$ $t_{\text{tab}} = 3,18$ | $t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$ |

El resultado del estudio de precisión del método desarrollado aparece reportado en la tabla 2.

TABLA 2. Estudio de la precisión del método analítico

| Analista 1 | | Analista 2 | |
|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| Día 1 | Día 2 | Día 1 | Día 2 |
| (%) | (%) | (%) | (%) |
| 100,8 | 99,8 | 103,3 | 101,9 |
| 100,4 | 100,5 | 101,1 | 102,3 |
| 99,9 | 100,1 | 102,9 | 100,8 |
| 101,3 | 102,3 | 101,1 | 101,5 |
| 102,3 | 101,8 | 102,5 | 102,5 |
| 101,9 | 101,0 | 101,2 | 101,8 |
| Media= 101,1 % | Media= 100,9 % | Media= 102,0 % | Media= 101,8 % |
| CV= 0,90 % | CV= 0,96 % | CV= 0,98 % | CV= 0,59 % |
| CV ≤ 1,5 % | CV ≤ 1,5 % | CV ≤ 1,5 % | CV ≤ 1,5 % |
| $t_{cal}= 1,81$ | | $F_{cal}= 1,21$ | |
| $t_{tab}= 2,33$ | | $F_{tab}= 5,05$ | |

Al analizar los resultados obtenidos por el método desarrollado y el reportado, se demuestran que no existen diferencias significativas, $t_{cal}= 1,98$ y $t_{tab}= 2,33$.

En la tabla 3 aparecen reportados los resultados obtenidos del estudio de exactitud.

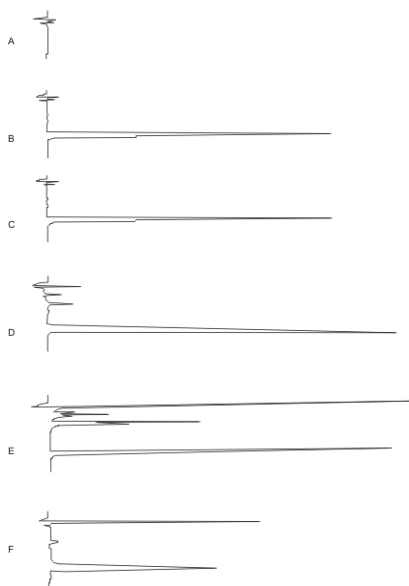
TABLA 3. Resultados de estudio de exactitud

| Parámetros | Resultados | | Límites |
|----------------------|---|---------------------------------------|----------------------------------|
| | UV | HPLC | |
| Ecuación de la recta | $y= - 0,00745 x + 0,07136$ $r= 0,99952$ | $y= 0,9815 x + 0,0136$ $r= 0,9994$ | $y= a x + b$ $r \geq 0,99000$ |

| | | | |
|-------------------------------------|--|---|----------------------|
| Prueba de linealidad | $CV_f = 2,61 \%$ | $CV_f = 1,58 \%$ | $CV_f < 5,0 \%$ |
| Recuperación media | 99,8 % | 100,5 % | 98,0-102,0 % |
| Prueba de proporcionalidad | $t_{calc} = 0,935$ $t_{tab} = 3,18$ | $t_{calc} = 2,85$ $t_{tab} = 3,18$ | $t_{calc} < t_{tab}$ |
| Influencia del factor concentración | $G_{calc} = 0,6978$ $G_{tab} = 0,871$ | $G_{calc} = 0,8019$ $G_{tab} = 0,8709$ | $G_{calc} < G_{tab}$ |

Validación del método para el estudio de estabilidad

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 idoxiuridina en el colirio (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, ácida 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 del placebo; B: cromatograma de la solución de referencia química; C: cromatograma de la muestra; D: cromatograma de la muestra degradada por hidrólisis ácida; E: cromatograma de la muestra degradada por hidrólisis básica; F: cromatograma de la muestra degradada por oxidación.

FIG. Resultados del estudio de especificidad del método.

En la tabla 1 se reportan los resultados del estudio de la linealidad del sistema.

El resultado del estudio de precisión del método desarrollado aparece reportado en la tabla 4.

TABLA 4. Estudio de la precisión del método analítico

| Analista 1 | | Analista 2 | |
|---|---|---|---|
| Día 1 (%) | Día 2 (%) | Día 1 (%) | Día 2 (%) |
| 99,5 | 99,4 | 97,9 | 97,3 |
| 96,8 | 97,3 | 97,3 | 97,0 |
| 98,1 | 97,9 | 96,6 | 96,8 |
| 95,8 | 95,6 | 95,6 | 95,6 |
| 97,3 | 96,3 | 95,2 | 96,4 |
| 96,1 | 96,8 | 95,4 | 95,1 |
| Media= 97,2 % CV= 1,41 % CV ≤ 1,5 % | Media= 97,0 % CV= 1,36 % CV ≤ 1,5 % | Media= 96,3 % CV= 1,15 % CV ≤ 1,5 % | Media= 96,5 % CV= 0,88 % CV ≤ 1,5 % |
| $t_{cal}= 1,81$ $t_{tab}= 2,33$ | | $F_{cal}= 1,21$ $F_{tab}= 5,05$ | |

En la tabla 3 aparecen reportados los resultados obtenidos del estudio de exactitud

Discusión

Validación del método para el control de la calidad

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 para el control de la calidad al no observarse absorbancia del placebo a la longitud de onda máxima del principio activo. Sin embargo, al presentarse interferencias en los análisis de las muestras sometidas a condiciones drásticas, se considera que el método no es específico para el estudio de estabilidad del colirio.

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 establece 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 nos asegura la buena precisión del método. En los valores obtenidos para el estudio de la precisión intermedia 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 estudio de comparación estadístico del método analítico desarrollado y reportado se verificó que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos, porque al realizar la prueba de la t de Student el valor calculado resultó ser menor que el tabulado.

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 del método para el estudio de estabilidad

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 entre 240 y 560 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

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 garantiza 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 y la buena precisión del método según el límite para los métodos cromatográficos $\text{CV} \leq 2$ %. En los valores obtenidos para el estudio de la precisión intermedia 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 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 y nos indican que la concentración no influye en la variabilidad de estos.

No existen diferencias significativas entre la recuperación media 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 8 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 validados para el control de calidad y el estudio de estabilidad del colirio de idoxiuridina 0,1 % son adecuados para estos fines y resultaron ser lineales, precisos, exactos y específicos en el rango de concentraciones estudiado.

Summary

Validation of the analytical methods for the quality control and the stability study of idoxuridine 0.1 % eye drops

Two analytical methods were validated by ultraviolet chromatography and high performance liquid chromatography for the quality control and stability study, respectively, in the idoxuridine 0.1 % eye drops. In the validation, there were evaluated the parameters of specificity for these ends, system lineality, exactness and accuracy, which was expressed in its 2 forms: repeatability and intermediate precision. The analytical methods proved to be specific, lineal, precise and exact in the interval of the studied concentrations.

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

Referencias Bibliográficas

1. Martindale W. The extra pharmacopoeia. 28th ed. London: Pharmaceutical Press; 1989. p. 1224 -6.
2. Goodman A, Gilman, A. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Tomo II. 3ra ed. La Habana: Editorial Científico Técnica; 1994. p. 791. (Edición Revolucionaria).
3. United States Pharmacopoeial Convention, USP 23-NF 17. Validation of compendial methods. 23 ed. Rockville: Mack Printing; 1995. p. 1982-4.
4. 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.
5. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of analytical procedures, ICH-Q2A, Geneva, 1995.
6. ISO 2854:76 Interpretación estadística de datos. Técnicas de estimación y dójimas relativos a las medidas y las varianzas. 1991
7. Farmacopea de los Estados Unidos (USP 27). 2004. p. 959 -60.

Recibido: 10 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 Ciencia Farmacéutica. Investigadora Aspirante.**

² **Técnica en Tecnología Farmacéutica.**