

ARTÍCULOS ORIGINALES

Validación del método analítico para el control de la calidad y estudio de estabilidad de ribavirina inyectable 100 mg/mL**Validation of a analytical method for quality control and stability study of 100 mg.mL injectable Ribavirin**

Anna Karelia Collado Coello^I; Odalys Maria Moreno López^{II}; Caridad Margarita García Peña^I; Martha Gómez Carril^{III}; María Aurora Barrios^{IV}; Marisleydi Begué David^V

^IMáster en Tecnología y Control de Medicamentos. Investigadora Agregada. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). La Habana, Cuba.

^{II}Licenciada en Bioquímica. CIDEM. La Habana, Cuba.

^{III}Máster en Tecnología y Control de Medicamentos. Investigadora Auxiliar. CIDEM. La Habana, Cuba.

^{IV}Doctora en Ciencias. Instituto de Farmacia y Alimentos. La Habana, Cuba.

^VTécnico en Tecnología de la Salud. CIDEM. La Habana, Cuba.

RESUMEN

El inyectable de ribavirina 100 mg/mL se emplea en la práctica médica como antiviral de amplio espectro, combinado de forma efectiva con el interferón alfa-2 beta, contra una gran variedad de virus DNA y RNA. En este trabajo se desarrolló y validó un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución, para el control de la calidad y los estudios de estabilidad del inyectable de ribavirina 100 mg/mL. El método se basó en la separación del principio activo a través una columna cromatográfica Lichrospher RP-18 (5 µm) (250 x 4 mm), con detección ultravioleta a 207 nm, para lo cual se empleó una fase móvil compuesta por una solución de dihidrógeno fosfato de potasio 0,01 M a pH 4,5, con una velocidad de flujo de 1,0 mL/min. La curva de calibración se realizó en el intervalo de 60 al 140 %, donde fue lineal con un coeficiente de correlación igual a 0,9996; la prueba estadística para el intercepto y la pendiente se consideró no significativa. Se obtuvo un recobrado del 99,87 % en el intervalo de concentraciones estudiados y las

pruebas de Cochran (G) y Student (t) resultaron no significativas. El coeficiente de variación en el estudio de la repetibilidad fue igual a 0,79 % para las 6 réplicas ensayadas, mientras que en los análisis de la precisión intermedia las pruebas de Fischer y Student fueron no significativas. El método analítico resultó lineal, preciso, específico y exacto en el intervalo de concentraciones estudiadas.

Palabras clave: HPLC/métodos, ribavirina, validación.

ABSTRACT

The 100 mg/mL Ribavirin injectable is used in medical practice as a broad spectrum antiviral combined in an effective way with 2'-5'-Interferon against a great variety of ADN and ARN viruses. In present paper an analytical method by a high resolution liquid chromatography to quality control and stability studies of 100 mg/ml Ribavirin injectable. Method was based on separation of active principle through a Lichrospher RP-18 (5 µm) (250 x 4 mm) chromatography column with UV detection at 207 nm using a mobile phase composed by a dihydrogen phosphate of 0.01 M at pH 4.5 with a flow speed of 1.0 mL/min. Calibration curve was carried out in the 60-140 % interval where it was linear with a correlation coefficient similar to 0.9996, statistical test for the interceptive and slope weren't significant. A recovery of 99.87 % was achieved in the interval of study concentrations and the Cochran's and Student's tests (G). Variation coefficient in repetition study was similar to 0.79 % for the six assayed replicas whereas in intermediate accuracy analysis the Fischer's and Student's tests weren't significant. Analytical method was linear, accuracy, specific and exact in the interval of study concentrations.

Key words: HPLC/methods, Ribavirin, validation.

INTRODUCCIÓN

La ribavirina es un análogo de nucleósido que estructural y funcionalmente se asemeja a la guanosina. Es activa contra una amplia gama de virus DNA y RNA *in vitro*, pero tiene pobre actividad *in vivo*. Numerosos mecanismos de acción han sido propuestos; en su forma monofosfatada, la ribavirina es un inhibidor competitivo potente de la enzima dehidrogenasa la cual es esencial para la síntesis de trifosfato de guanosina. Esta inhibición resulta en una disminución en los depósitos celulares de guanidina, necesaria tanto para la multiplicación viral como celular. Sin embargo, su mayor efecto antiviral de significación es la inhibición en la terminación o punto final del RNA mensajero viral y produce una caída en la producción de proteínas virales. También ha sido autorizado su empleo en niños con bronquiolitis severa por causa del virus sincitial respiratorio.^{1,2}

El desarrollo de técnicas o métodos analíticos novedosos o la adecuación de algunos ya reportados constituye 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.³⁻⁵

Los parámetros analíticos evaluados en la validación del método, fueron: exactitud, precisión, especificidad, robustez y linealidad.⁶

El objetivo del presente trabajo fue el desarrollo y la validación de un método analítico para la determinación del principio activo en el inyectable de ribavirina 100 mg/mL, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC en inglés).

MÉTODOS

La sustancia de referencia química de ribavirina fue suministrada por el grupo de sustancias de referencia del Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM, La Habana, Cuba), la cual fue analizada por el método cromatográfico establecido para realizar el control de la calidad de la materia prima, con una pureza de 99,2 %. El producto terminado en forma de inyectable compuesto por la ribavirina, ácido cítrico monohidratado, hidróxido de sodio y agua para inyección, fue elaborado en el CIDEM, identificado como el lote 7001, fabricado en diciembre de 2007, con fecha de vencimiento diciembre de 2009, el cual cumplió con las especificaciones de calidad establecidas para el control de la calidad de los inyectables.

Todos los reactivos utilizados fueron de grado HPLC. En el ensayo se empleó un cromatógrafo (Knauer) con detector UV/VIS (Knauer) ajustado a 207 nm, un inyector con un loop de 20 µL e integrador (SHIMADZU CR 8 A). La separación se realizó isocráticamente empleando una columna Lichrospher RP-18 (5 µm) (250 x 4 mm) y un flujo de 1,0 mL/min. La fase móvil óptima, consistió en una solución de dihidrógeno fosfato de potasio 0,01 M a pH 4.

La solución de referencia se obtuvo disolviendo ribavirina, sustancia de referencia, en 50 mL de fase móvil; se aplicó ultrasonido durante 10 min hasta disolución total y se completó hasta un volumen de 100 mL con la misma solución, para lograr una solución con una concentración final de 200 µg/mL.

En la preparación de la solución de ensayo para la valoración, se disolvió una alícuota de la muestra del inyectable en fase móvil hasta un volumen de 100 mL, para lograr una solución con una concentración final de 200 µg/mL.

Validación del método analítico

La validación fue realizada según la categoría I (USP-30) y la Regulación 41-2007 del Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED), para la validación de métodos de análisis; se evaluaron los parámetros que a continuación se describen:^{3,6}

Linealidad

Para el análisis de la linealidad se realizó el modelo de 3 determinaciones para 5 concentraciones diferentes: 60, 80, 100, 120, y 140 %. Se determinaron la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación, la prueba de significación estadística de

significación de la pendiente S_b rel (%), los coeficiente de variación de los factores de respuesta y el ensayo de proporcionalidad.

Exactitud

Para el análisis de exactitud se realizó el modelo de 3 réplicas para 3 concentraciones diferentes: 80, 100, 120 %; se determinaron el porcentaje de recuperación, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Se aplicó además el ensayo de Cochran con vistas a comprobar si la variación de la concentración producía diferencias significativas en los resultados y la prueba de la t de Student para determinar diferencias significativas entre la recuperación media y el 100 %.

Precisión

Para el estudio de la precisión se aplicó el modelo de repetibilidad con 6 réplicas. Con ellas se determinaron los valores medios, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

De igual manera para el ensayo de la precisión intermedia se utilizaron 3 valores de concentración que correspondieron al 80, 100 y 120 % para 2 analistas y 3 días diferentes. Se aplicó la prueba de Fisher y de la t de Student para determinar si existían diferencias significativas entre los resultados al variar las condiciones de análisis.

Especificidad

Para el estudio de especificidad se analizaron la sustancia de referencia de ribavirina, una mezcla de excipientes sin el principio activo, las muestras del producto terminado en forma de inyectable y muestras sometidas a condiciones drásticas, como: hidrólisis ácida (con ácido clorhídrico 5 N), hidrólisis básica (con hidróxido de sodio 5 N) y oxidación (con peróxido de hidrógeno).

Criterio de aceptación: No debían obtenerse señales del placebo y de los productos de degradación en la zona de elusión del principio activo. Las áreas bajo las curvas del patrón y de la ribavirina en el producto terminado debían ser similares.

RESULTADOS

La [figura](#) muestra los resultados del estudio de especificidad del método. Se observa en el cromatograma correspondiente a la muestra formada por la mezcla de excipientes (A) que no se obtuvo ninguna señal en la zona de interés, al ser comparado con la señal obtenida para la sustancia de referencia (B) y de la muestra de ribavirina en el inyectable (C), lo cual indica que los excipientes o sustancias auxiliares de la formulación no interfieren en la determinación del principio activo. En cuanto a las muestras sometidas a condiciones drásticas de: hidrólisis básica, hidrólisis ácida y la muestra sometida a la oxidación, luz, que se

observan en los cromatogramas (D, E y F), la aparición de picos secundarios es atribuible a un posible producto de degradación, el cual no interfiere en la determinación del principio activo.

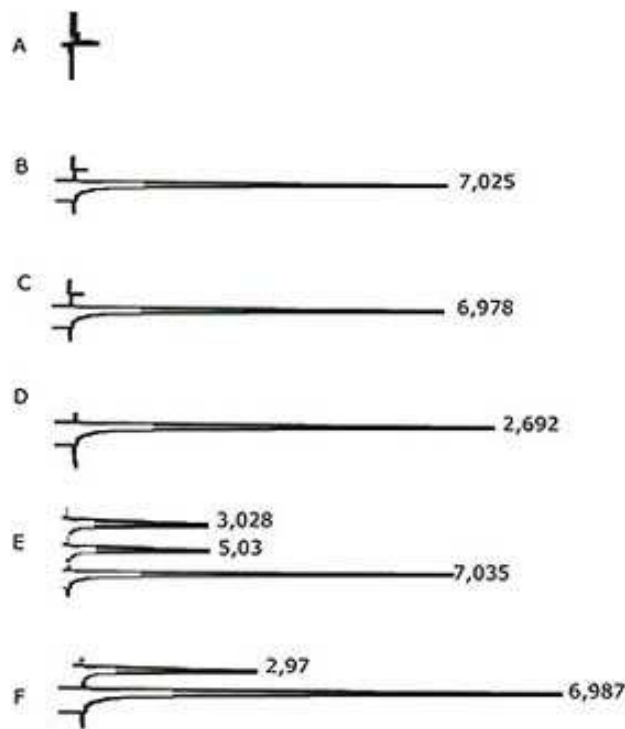


Fig. Resultados del estudio de especificidad del método. A) Cromatogramas de la muestra placebo, B) solución de referencia química, C) muestra, D) muestra sometida a hidrólisis básica, E) muestra sometida a hidrólisis ácida, F) muestra sometida a oxidación.

En los resultados de los estudios de la linealidad del sistema ([tabla 1](#)), el coeficiente de regresión lineal fue de 0,9996 y el coeficiente de variación del factor de res

Tabla 1. Resultados del estudio de linealidad

Parámetros	Resultados	Límites
Ecuación de la recta	$Y = 0,8336 x + 1,71628$	$Y = bX + a$
Coefficiente de regresión lineal	$r = 0,9996$	$r \geq 0,990$
Coefficiente de determinación	$r^2 = 0,9992$	$r^2 \geq 0,980$
Significación estadística de la varianza de la pendiente (b)		
Desviación estándar relativa de la pendiente	$Sb_{rel} (\%) = 1,63$	$Sb_{rel} (\%) \leq 2 \%$
Coeficiente de variación de los factores de respuesta		
Coefficiente de variación del factor de respuesta	$CV_f = 4,87 \%$	$CV_f \leq 5 \%$

Y: área; x: concentración; b: pendiente; a: intercepto; r: coeficiente de regresión lineal; r^2 : coeficiente de determinación; Sb_{rel} : desviación estándar relativa de la pendiente; CV_f : coeficiente de variación del factor de respuesta.

puesta resultó igual a 4,87 %.

En el estudio de repetibilidad realizado, la media obtenida fue de 103,7 % y el coeficiente de variación fue de 0,79 %. Los resultados del estudio de precisión intermedia del método aparecen reportados en la [tabla 2](#). se observan que los valores de F calculadas y los valores de t calculadas fueron menores que los valores tabulados, para cada uno de los analistas, días estudiados en cada uno de los niveles, para un 95 % de confianza, para cada uno de los niveles estudiados.

Tabla 2. Resultados del estudio de la precisión intermedia del método analítico

Niveles (%)	Analista 1 (%)			Analista 2 (%)		
	Primer día	Segundo día	Tercer día	Primer día	Segundo día	Tercer día
80	80,3 ± 0,2	80,6 ± 0,7	80,8 ± 0,1	80,6 ± 0,2	80,6 ± 0,1	80,5 ± 0,1
100	101,4 ± 0,1	101,4 ± 0,3	101,8 ± 0,1	100,9 ± 0,0	101,3 ± 0,2	101,6 ± 0,1
120	120,6 ± 0,3	120,3 ± 0,3	120,3 ± 0,3	120,2 ± 0,2	120,8 ± 0,1	120,6 ± 0,0
Análisis estadístico						
Prueba de Fischer						
Niveles (%)	Prueba de significación de Fisher					Límites
	Por analistas ($F_{\text{tab}}(8/8; 0,05) = 3,44$)	Por día ($F_{\text{tab}}(5/5; 0,05) = 5,05$)				
		Días 1/2	Días 2/3	Días 1/3		
80	2,70	2,30	1,88	4,32	$F_{\text{exp}} \leq F_{\text{tab}}$	
100	2,53	2,08	3,07	1,47		
120	1,18	1,18	1,32	1,57		
Niveles (%)	Prueba de significación de la t de Student					Límites
	Por analistas ($t_{\text{tab}}(16; 0,05) = 2,12$)	Por día ($t_{\text{tab}}(10; 0,05) = 2,22$)				
		Días 1/2	Días 2/3	Días 1/3		
80	1,49	0,77	0,94	1,00	$F_{\text{exp}} \leq F_{\text{tab}}$	
100	2,08	2,13	2,12	0,28		
120	0,87	0,81	2,19	0,80		
Coeficientes de variación						
Niveles (%)	Analista 1	Analista 2		Límites		
80	0,47	0,13		CV ≤ 2,0 %		
100	0,25	0,31				
120	0,03	0,26				

t_{cal} : t calculada; F_{cal} : F calculada; t_{tab} : t tabulada; F_{cal} : F tabulada.; %: los valores de porcentaje de principio activo (n= 3) se representan como valor medio ± desviación estándar relativa. Niveles: porcentaje de la concentración principio activo declarado en la formulación.

En la [tabla 3](#), aparece reportado los resultados del estudio de exactitud. La recuperación media fue de 99,87 % y el valor de t calculada (1,773) y de G

calculada (0,606) fueron menores que los valores tabulados, para un 95 % de confianza, t tabulada 2,306 y G tabulada 0,797.

Tabla 3. Resultados del estudio de exactitud.

Valor teórico (%)	Recuperación (%) \pm S	CV (%)	S ²
80	99,8 \pm 0,300	0,311	0,09
100	99,9 \pm 0,105	0,105	0,001
120	99,7 \pm 0,185	0,186	0,034
R= 99,87 % S= 0,2006 CV= 0,20 % $t_{cal}= 1,773 < t_{tab}= 2,306$ $G_{cal}= 0,606 < G_{tab}= 0,797$			

R_{media} : recuperación media; t_{cal} : t calculada; t_{tab} : t tabulada; G_{cal} : G calculada; G_{tab} : G tabulada. %: los datos corresponden al porcentaje de recuperación.

DISCUSIÓN

Los resultados del estudio de especificidad del método ([fig.](#)), demuestran la especificidad del método al no presentarse interferencias de picos adicionales en la zona de elución del producto principal, ya que los productos de degradación y los excipientes de la formulación presentan tiempos de retenciones diferentes al principio activo, todos inferiores al tiempo de retención de la ribavirina. En este estudio se considera que el método cromatográfico resultó ser específico, pues permite cuantificar el principio activo después de la degradación de este en muestras de medicamento sin interferencias de excipientes o productos de degradación.⁴

Los resultados del estudio de linealidad muestran coeficientes de regresión y de determinación superiores a los exigidos en la Regulación 41 de 2007 de nuestro centro regulador (CECMED), 0,99 y 0,98 respectivamente; se demuestra el valor del coeficiente de correlación obtenido, cercano a la unidad, la existencia de correlación con una probabilidad elevada, así como el grado de relación entre las variables concentración y respuesta detectada por el equipo empleado. También el coeficiente de variación de los factores de respuesta y la desviación estándar relativa de la pendiente fueron inferiores al normado como máximo para estos indicadores: 5 y 2 %, respectivamente, ambos son considerados estimadores puntuales que permiten caracterizar la variabilidad. El valor obtenido del CV_f permitió demostrar que existe variabilidad en la relación respuesta y concentración para cada nivel evaluado. El intervalo de confianza del intercepto incluye al cero, lo que permite excluir la significación del error del intercepto. Se demuestra con estos resultados la linealidad del método propuesto.

En el estudio de la repetibilidad ([tabla 2](#)) realizado a una misma muestra, por el mismo analista, el mismo día, a través de 6 réplicas, se alcanzó un coeficiente de variación adecuado (0,20 %), lo que demostró la buena precisión del método; se

observó una variabilidad de los resultados dentro de los límites establecidos para los métodos cromatográficos: $CV \geq 2,0 \%$.⁶

Los valores que se obtienen en el estudio de precisión intermedia, de las pruebas de Fischer y de la t de Student, para el estudio de la precisión intermedia demostraron que no existían diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por los analistas en diferentes días para una probabilidad de 0,05 %, ya que el valor de F calculada es menor que la F tabulada, este resultado permitió establecer que las precisiones son similares ([tabla 2](#)). Al realizar la prueba de la t de Student el valor calculado resultó menor que el tabulado, para una probabilidad de 0,05, lo cual demostró que no existían diferencias significativas entre las medias alcanzadas, con un nivel de significación de un 5 %.

Los valores de porcentaje de recobrado estuvieron dentro de los límites establecidos para los métodos cromatográficos (98-102 %) y los valores del coeficiente de variación para cada uno de los valores de concentración estudiados resultaron ser menor que el 2 %.⁴ 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 calculada fue menor que G tabulada para una probabilidad de 0,05, $k= 3$ y $n= 3$; por lo tanto, las varianzas de las concentraciones empleadas son equivalentes indicando que la concentración no influye en la variabilidad de estos. Al realizar la prueba de significación entre la recuperación media y el 100,0 % de recuperación, con un coeficiente de variación de 0,35 %, se obtuvo una t calculada menor que t tabulada.⁶ Los resultados demostraron la capacidad del método para dar resultados cercanos al valor verdadero, observándose una buena exactitud.

El método analítico validado, por HPLC, para la cuantificación del principio activo del inyectable de ribavirina para el control de la calidad y el estudio de estabilidad, resultó ser lineal, preciso, exacto, robusto y específico, en el intervalo de concentraciones establecido del 60 al 140 %.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Goodman A, Gilman A. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Tomo II. 3ra ed. La Habana: Editorial Científico Técnica; 1994. p. 466-7. (Edición Revolucionaria).
2. PDR. Physician's Desk Reference. 57 ed. New York: Inc at Montuale; 2003. p. 332, 2193, 2905, 3270.
3. Farmacopea de los Estados Unidos-USP 30. Ed. The United States Pharmacopeial Convention. Estados Unidos de América NF-25. 30 ed. Rockville: Mack Printing; 2007.
4. Quattrocchi OA, Laba RF. Introducción a la HPLC en Aplicación y práctica. Buenos Aires: Ed. Artes Gráficas Farro; p. 106-122, 284, 302-328. 1992
5. Dierksneier G. Métodos cromatográficos. La Habana: Ed. Científico-Técnica; 2005. p. 1-4, 256-412.
6. Validation of Analytical Procedures. Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Geneva: International Conference on Harmonization, ICH-Q2A; 1995.

Recibido: 8 de de 2010.
Aprobado: 17 de de 2010.

MSc. *Anna Karelia Collado Coello*. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Ave. 26 No. 1 605 entre Boyeros y Puentes Grandes. CP 10 600. Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba. Correo electrónico: karelia.collado@cidem.sld.cu