

Desarrollo y validación de un método analítico para el control de calidad y estabilidad de fenilefrina 10 % colirio y tropicamida 1 %

Development and validation of an analytical method for quality control and the stability of the eyedrops 10 % Phenylephrine and the 1 % Tropicamide

Caridad Margarita García Peña^I; Martha Botet García^{II}; Yenilen Troche Concepción^{II}; Georgy Zúñiga Dedorite^{III}; Yanet Montes de Oca Porto^{IV}

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

^{II}Máster en Tecnología y Control de Medicamentos. Empresa Farmacéutica "Julio Trigo". La Habana, Cuba.

^{III}Máster en Tecnología y Control de Medicamentos. Ingeniero Químico. Empresa Farmacéutica "Julio Trigo". La Habana, Cuba.

^{IV}Técnico Medio en Química. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Se desarrolló y validó un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución, aplicable al control de la calidad y el estudio de estabilidad de fenilefrina 10 % más tropicamida 1 %, colirio. Para cuantificar simultáneamente los 2 principios activos en el producto terminado, la separación se realizó a través de una columna cromatográfica Lichrosorb RP-18 (5 µm) (250 x 4 mm), con detección ultravioleta a 253 nm, empleando una fase móvil compuesta por metanol:agua destilada (1:1), con 1,1 g de 1-octanosulfonato de sodio por litro ajustado pH a 3,0 con ácido fosfórico y la cuantificación de este frente a una muestra de referencia con el método del estándar externo. El método analítico desarrollado resultó lineal, preciso, específico y exacto en el rango de concentraciones estudiadas, el cual se estableció para el control de la calidad y el estudio de

estabilidad del producto terminado ya que no existían métodos analíticos reportados para estos fines.

Palabras clave: Fenilefrina, tropicamida, validación.

ABSTRACT

An analytical high-performance liquid chromatography method was developed and validated applicable to quality control and to stability study of 10 % phenylephrine plus eyedrops 1 % tropicamide. To quantify simultaneously both active principles in the finished product, separation was carried out through a Lichrosorb RP-18 (15 µm) (260 x 4 mm) column chromatography, with ultraviolet detection at 253 nm using the mobile phase composed of methanol: distilled water (1:1), with 1.1 g of sodium 1-octasulfanate by litre and pH fitted to 3.0 with phosphoric acid and the quantification of this front to a reference sample using the external standard method. The analytical method developed was linear, precise, specific and accurate in the rank of study concentrations, established for the quality control and stability study of the finished product since there were not analytical methods designed for these aims.

Key words: Phenylephrine, tropicamide, validation.

INTRODUCCIÓN

El colirio de fenilefrina 10 % más tropicamida 1 %, se emplea en la práctica médica como Antihistamínico, analgésico, midriático, cicloplégico.

No se reportan métodos por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), para la determinación simultánea de fenilefrina y tropicamida en el colirio.

La CLAR le brinda la posibilidad al analista de emplear esta herramienta para solucionar los inconvenientes de los métodos espectrofotométricos en los estudios de estabilidad, pues además de presentar una alta sensibilidad y exactitud, es en esencia un método separativo; lo que permite medir con gran selectividad el compuesto deseado, siempre y cuando se encuentre un sistema cromatográfico que asegure una adecuada separación.^{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 esperado.

Los parámetros analíticos que pueden ser considerados en la validación de un método analítico, según se expresa en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP, 30), son exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango, tolerancia y robustez.^{3,4}

El presente trabajo tiene como objetivo desarrollar y validar un método analítico para el control de la calidad y el estudio de estabilidad de fenilefrina 10 % más tropicamida 1 % colirio.

MÉTODOS

Las sustancias de referencias química de fenilefrina clorhidrato y tropicamida se suministraron por el grupo de sustancias de referencia del Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM, La Habana, Cuba), las cuales se analizaron por los métodos cromatográficos establecidos para realizar el control de la calidad de cada una de las materias primas, con una pureza de 99,5 y 99,6 %, respectivamente. El producto terminado en forma de colirio, se elaboró en la Empresa Farmacéutica «Julio Trigo», identificado como el lote 7001, fabricado en diciembre del 2007, con fecha de vencimiento diciembre del 2009, el cual cumplió con las especificaciones de calidad establecidas para el control de la calidad de los colirios.

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica. En el ensayo se empleó un cromatógrafo (KNAUER) con detector UV/VIS (KNAUER) ajustado a 253 nm, un inyector con un rulo de 20 µL e integrador (SHIMADZU CR 8 A). La separación se realizó isocráticamente para lo que se empleó una columna Lichrosorb RP-18 (5 µm) (250 x 4 mm) y un flujo de 1,0 mL/min. La fase móvil óptima, consistió en una mezcla desgasificada de metanol:agua destilada (1:1), con 1.1 g de 1-octanosulfonato de sodio por litro ajustado pH a 3,0 con ácido fosfórico. Como diluyente se empleó una mezcla de metanol:agua destilada (1:1), a pH 3,0.

Preparación de la muestra: se tomó 1 mL de muestra, se trasvasó a volumétrico de 100 mL adicionándose diluyente, se aplicó ultrasonido por 3 min y se completó volumen con diluyente. (Concentración de trabajo 1 mg/mL de fenilefrina y 0,1 mg/mL de tropicamida).

Preparación de la sustancia de referencia química tropicamida: se pesaron 10 mg de sustancia de referencia química de tropicamida y se trasvasó a un volumétrico de 10 mL adicionándose diluyente, se aplicó ultrasonido por 5 min y se completó volumen con diluyente (solución T).

Preparación de la sustancia de referencia química (fenilefrina más tropicamida): se pesaron 10 mg de sustancia de referencia química de fenilefrina y se trasvasó a un volumétrico de 10 mL adicionándose 4 mL de diluyente y 1 mL de solución T, se aplicó ultrasonido por 5 min y se completó volumen con diluyente (concentración de trabajo 1 mg/mL de fenilefrina y 0,1 mg/mL de tropicamida).

Validación del método analítico

La validación fue realizada según la categoría I (USP, 30) y la Regulación 41-2007 (CECMED); se evaluaron los parámetros que a continuación se describen:

Linealidad: se realizaron los modelos de 3 determinaciones para 5 concentraciones diferentes: 60, 80, 100, 120, y 140 % de cada uno de los principios activos a cuantificar (fenilefrina y tropicamida). Se determinaron las ecuaciones de las rectas, los coeficientes de correlación, las pruebas de significación estadística de significación de la pendiente S_b rel (%) y los coeficientes de variación de los factores de respuesta.

Exactitud: se realizaron los modelos de 3 réplicas para 3 concentraciones diferentes: 80, 100, 120 %, de cada uno de los principios activos a cuantificar (fenilefrina y tropicamida); se determinaron los % de recuperación, las desviaciones estándar y los coeficientes de variación. Se determinaron además las pruebas de Cochran con vistas a comprobar si la variación de la concentración produce diferencias significativas en los resultados y las pruebas de la t de Student para la determinación de las diferencias significativas entre la recuperación media y el 100 %.

Precisión: se sugieren los modelos de repetibilidad 6 réplicas para cada uno de los principios activos a cuantificar (fenilefrina y tropicamida). Con ellas se determinarán los valores medios, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

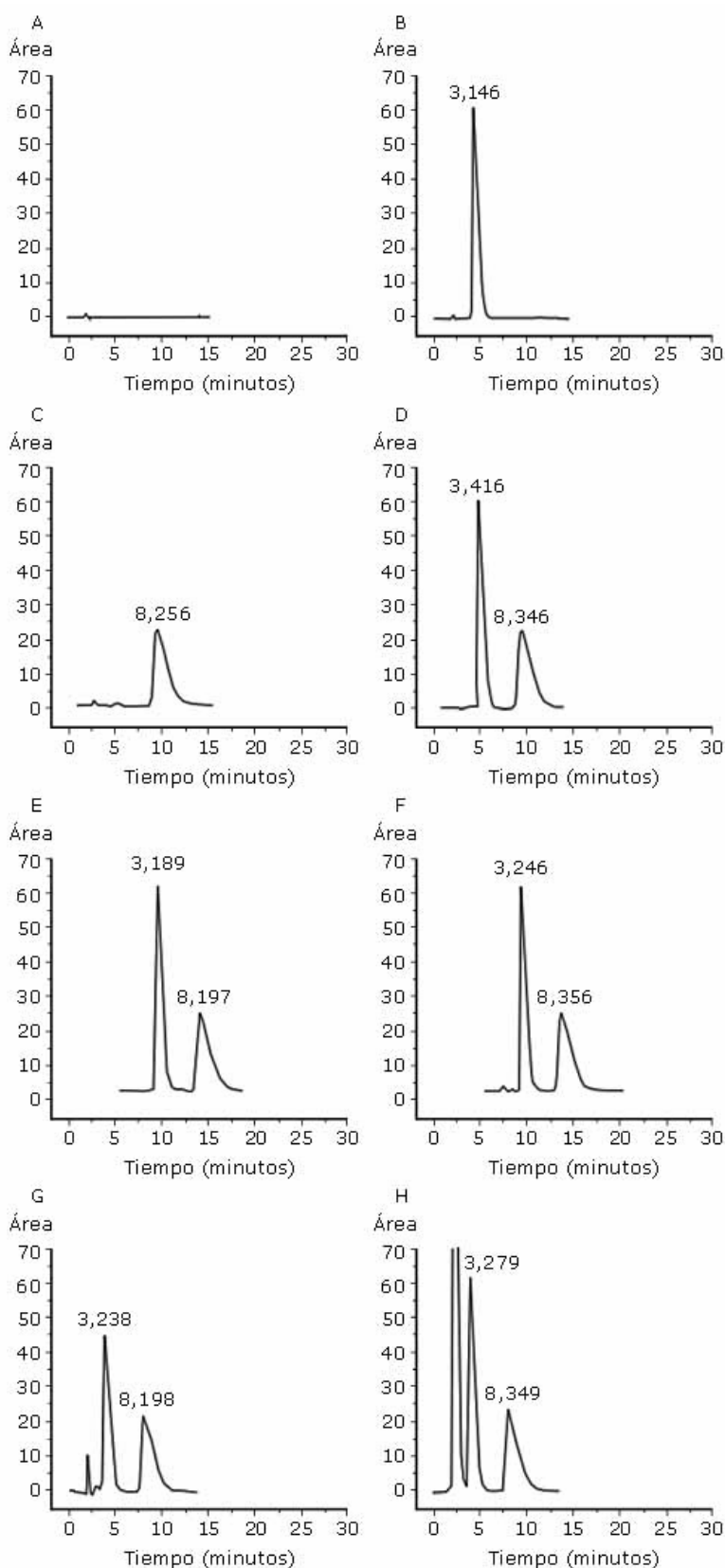
De igual manera para los ensayos de la precisión intermedia se utilizaron 3 niveles de concentración que corresponden al 80, 100 y 120 %, para cada uno de los principios activos a cuantificar (fenilefrina y tropicamida), para 2 analistas y 3 días diferentes. Se aplicaron las pruebas de Fisher y de la t de Student para determinar si existían diferencias significativas entre los resultados al variar las condiciones de análisis.

Especificidad: se analizaron la sustancia de referencia de fenilefrina, la sustancia de referencia de tropicamida, el placebo sin tropicamida y sin fenilefrina, el placebo sin tropicamida y con fenilefrina, el placebo con tropicamida y sin fenilefrina; las muestras de producto terminado y muestras sometidas a condiciones drásticas como: hidrólisis ácida HCl 1 N, hidrólisis básica NaOH 1 N y oxidación con peróxido de hidrógeno.

Criterio de aceptación: no debe obtenerse señales de los placebos y de los productos de degradación en la zona de elusión del principio activo a cuantificar. Las áreas bajo las curvas de los patrones, así como los tiempos de retención y de los principios activos a cuantificar, en el producto terminado deben ser similares.

RESULTADOS

La figura muestra los resultados obtenidos en el estudio de especificidad del método. Como se observa en el cromatograma correspondiente a la muestra placebo, no se obtuvo ninguna señal en la zona de interés, al ser comparado con la señal obtenida para las soluciones estándar de referencias y de la muestra de colirio, 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 ácida y oxidación (cromatogramas E, F, G), se aprecia degradación por la disminución de la altura de los picos de los principios activos, con la aparición de picos secundarios con tiempos de retención inferiores que no interfieren en la determinación de ambos principios activos.



A: placebo sin tropicamida y sin fenilefrina; B: placebo sin tropicamida y con fenilefrina; C: placebo con tropicamida y sin fenilefrina; D: solución de referencia química (fenilefrina más tropicamida); E: muestra; F: muestra sometida a hidrólisis básica; G: muestra sometida a hidrólisis ácida; H: muestra sometida a oxidación.

Fig. Cromatogramas de los resultados del estudio de especificidad del método.

En la tabla 1 se reportan los resultados del estudio de la linealidad del sistema; para la fenilefrina y la tropicamida, los coeficientes de regresión lineal fueron de 0,9993 y 0,9990, respectivamente, y los coeficientes de variación de los factores de respuesta resultaron iguales a 4,12 y 4,76.

Tabla 1. Estudio de linealidad

Parámetros	Fenilefrina	Tropicamida	Límites
Ecuación de la recta	$Y = 47,876X - 3,191$	$Y = 398,05X - 4,26$	$Y = bX + a$
Coefficiente de regresión lineal	$r = 0,9993$	$r = 0,9990$	$r \geq 0,990$
Coefficiente de determinación	$r^2 = 0,998$	$r^2 = 0,998$	$r^2 \geq 0,980$
Significación estadística de la varianza de la pendiente (b)			
Desviación estándar relativa de la pendiente	$S_{b_{rel}} (\%) = 1,67$	$S_{b_{rel}} (\%) = 1,95$	$S_{b_{rel}} (\%) \leq 2 \%$
Coefficiente de variación de los factores de respuesta			
Coefficiente de variación del factor de respuesta	$CV_F = 4,12 \%$	$CV_F = 4,76 \%$	$CV_F \leq 5 \%$

El resultado del estudio de precisión del método desarrollado aparece reportados en las tablas 2, 3 y 4. En el estudio de repetibilidad realizado para la fenilefrina y la tropicamida, las medias obtenidas fueron de 99,1 y 100,1 % y los coeficientes de variación fueron de 0,55 y 0,53 %, respectivamente, mientras que los valores de F y t calculadas resultaron menores que los valores tabulados para cada uno de los niveles estudiados; los valores tabulados para la prueba de Fischer fueron por analistas 3,44 y por días 5,05; mientras que para la prueba de la t de Student fueron por analistas 2,12 y por días 2,22 para un 95 % de confianza.

Tabla 2. Estudios de la repetibilidad del método analítico

Réplicas	Fenilefrina (%)	Tropicamida (%)
1	99,4	99,7
2	98,7	100,3
3	98,9	100,8
4	99,3	99,3
5	99,7	100,4
6	98,2	100,0
	$X_{media} = 99,1$ $CV = 0,55 \%$	$X_{media} = 100,1$ $CV = 0,53 \%$

Tabla 3. Estudio de la precisión intermedia del método analítico-fenilefrina

Niveles	Analista 1 (%)			Analista 2 (%)			
	Primer día	Segundo día	Tercer día	Primer día	Segundo día	Tercer día	
80 %	80,1	79,7	80,2	80,1	80,3	80,1	
	79,8	79,9	80,3	79,7	79,9	80,4	
	80,4	80,1	79,4	79,9	79,8	79,9	
100 %	99,7	99,9	99,6	99,5	99,3	100,1	
	99,5	100,2	99,4	99,9	99,8	99,3	
	99,9	99,7	100,1	100,3	100,2	99,6	
120 %	119,7	120,1	120,3	119,5	120,3	119,6	
	120,2	119,5	120,5	119,9	120,0	119,9	
	119,5	119,7	119,7	120,2	119,5	120,2	
Análisis estadístico							
Prueba de Fischer							
Prueba de significación de Fisher por analistas (F _{tab} (8/8; 0,05)= 3,44)		Prueba de significación de Fisher por días (F _{tab} (5/5; 0,05)= 5,05)				Límites	
		Niveles	Días 1/2	Días 2/3	Días 1/3	F _{exp} ≤ F _{tab}	
80	1,94	80	1,29	2,68	2,07		
100	1,98	100	1,28	1,00	1,28		
120	1,42	120	1,06	1,19	1,26		
Prueba de la t de Student							
Prueba de significación de Student por analistas (t _{tab} (16; 0,05)= 2,12)		Prueba de significación de Student por días (t _{tab} (10; 0,05)= 2,22)				Límites	
		Niveles	Días 1/2	Días 2/3	Días 1/3	t _{exp} ≤ t _{tab}	
80	0,23	80	0,37	0,60	0,28		
100	0,06	100	0,27	0,87	0,65		
120	0,07	120	0,27	0,90	0,90		
Coeficiente de variación							
	Niveles	Analista 1	Analista 2	Límites			
	80	0,40	0,29	CV ≤ 2,0 %			
	100	0,27	0,38				
	120	0,31	0,26				

Tabla 4. Estudio de la precisión intermedia del método analítico-tropicamida

Niveles	Analista 1 (%)			Analista 2 (%)		
	Primer día	Segundo día	Tercer día	Primer día	Segundo día	Tercer día
80 %	80,2	80,0	80,3	80,4	80,2	79,5
	80,4	79,6	79,8	79,4	80,0	79,8
	79,7	79,7	79,6	79,4	79,7	80,2
100 %	99,3	98,9	99,5	99,6	98,9	99,6
	99,9	99,4	99,3	99,0	99,3	99,1
	100,3	99,7	99,9	99,9	99,7	100,2
120 %	119,7	120,3	119,3	120,4	119,4	120,2
	120,2	118,9	119,9	120,0	119,8	120,2
	119,5	119,4	120,5	119,7	119,7	119,7
Análisis estadístico						
Prueba de significación de Fisher por analistas ($F_{tab}(8/8; 0,05) = 3,44$)		Prueba de significación de Fisher por día ($F_{tab}(5/5; 0,05) = 5,05$)				Límites
		Niveles	Días 1/2	Días 2/3	Días 1/3	F _{exp} ≤ F _{tab}
80	1,58	80	4,33	2,12	1,56	
100	1,10	100	1,70	1,23	1,38	
120	3,00	120	1,91	1,31	1,45	
Prueba de significación de Student por analistas ($t_{tab}(16; 0,05) = 2,12$)		Prueba de significación de Student por días ($t_{tab}(10; 0,05) = 2,22$)				Límites
		Niveles	Días 1/2	Días 2/3	Días 1/3	t _{exp} ≤ t _{tab}
80	0,55	80	0,07	0,20	0,15	
100	0,50	100	1,46	1,28	0,28	
120	0,73	120	1,45	1,38	0,03	
Coefficiente de variación						
Niveles		Analista 1		Analista 2		Límites
80		0,39		0,49		CV ≤ 2,0 %
100		0,42		0,44		
120		0,43		0,25		

En la tabla 5, aparecen reportados los resultados del estudio de exactitud. Para la fenilefrina, la recuperación media fue de 99,68 % y el valor de t calculada (1,96) y de G calculada (0,4526) resultaron menores que los valores tabulados, t tabulada 4,30 para un 95 % de confianza y G tabulada 0,8700 para un 95 % de confianza, k= 3 y n= 3. Mientras que para la tropicamida, la recuperación media fue de 99,58 % y el valor de t calculada (2,33) y de G calculada (0,5443) resultaron menores que los valores tabulados, t tabulada 4,30 para un 95 % de confianza, k= 3 y n= 3 y G tabulada 0,8700 para un 95 % de confianza, k= 3 y n= 3.

Tabla 5. Estudio de exactitud

Niveles	Recuperación fenilefrina (%)	Resultados fenilefrina	Recuperación tropicamida (%)	Resultados tropicamida	Límites
80 %	99,3	R _{media} = 99,68 %	99,0	R _{media} = 99,58 %	98,0-102,0 %
	99,8		99,3		
	100,1		98,9		
100 %	99,1	t _{calc} = 1,96 t _{tab} = 4,30	99,7	t _{calc} = 2,33 t _{tab} = 4,30	t _{exp} ≤ t _{tab}
	99,6		100,3		
	100,4		99,4		
120 %	99,0	G _{calc} = 0,4526 G _{tab} = 0,8700	99,3	G _{calc} = 0,5443 G _{tab} = 0,8700	G _{exp} ≤ G _{tab}
	100,2		99,9		
	99,6		100,4		

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el estudio de especificidad del método (fig.), demuestran la especificidad del método al no presentarse interferencias de picos adicionales en la determinación de cada uno de los principios activos, no se evidencian interferencias de los excipientes, ni de los productos de degradación.

Los resultados de los estudios de linealidad muestran coeficientes de regresión y de determinación superiores a los exigidos, 0,99 y 0,98 respectivamente, lo que demuestra con 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 de los coeficientes de variación de los factores de respuesta, permite 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 los resultados obtenidos la linealidad del método propuesto.

En los estudios de la repetibilidad (tabla 2) realizado a una misma muestra, por el mismo analista, el mismo día, a través de 6 réplicas, se alcanzaron coeficientes de variación adecuados, lo que demuestra la buena precisión del método; se observa una variabilidad de los resultados dentro de los límites establecidos para los métodos cromatográficos: $CVd \leq 2,0 \%$.

Los valores que se obtienen en los estudios de precisión intermedia, de las pruebas de Fischer y t de Student, para el estudio de la precisión intermedia demuestran que no existen diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por los analistas en diferentes días para un 95 % de confianza, ya que los valores de F calculadas son menores que la F tabulada, estos resultados permiten establecer que las precisiones son similares (tabla 3 y 4). Al realizar las pruebas de la t de Student, los valores calculados resultaron menores que el tabulado, para un 95 % de confianza, lo cual demuestra que no existen diferencias significativas entre las medias alcanzadas, con un nivel de significación de un 5 %.

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 las G calculadas fueron menores que la G tabulada para un 95 % de confianza, $k= 3$ y $n= 3$; por lo tanto, las varianzas de las concentraciones empleadas son equivalentes, lo que indica 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, los coeficientes de variación fueron: fenilefrina de 0,49 % y tropicamida de 0,54 %, los valores de t calculada resultaron menores que la t tabulada. En el rango seleccionado en el estudio de exactitud, los valores de porcentaje de recobro están 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, fueron menores que el 2 %.

El método analítico desarrollado y validado por CLAR para el control de la calidad y el estudio de estabilidad del colirio de fenilefrina 10 % y tropicamida 1 %, resultó específico, lineal, exacto y preciso en el rango de concentraciones estudiadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dierksneier G. Métodos cromatograficos. La Habana: Ed. Científico-Técnica; 2005. p. 1-4, 256-412.
2. Guidance for Industry. Analytical Procedures and Methods Validation Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation. New York: FDA/Center For Drug Evaluation and Research; 2001.
3. International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedures. Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals For Human Use. Geneva: ICH-Q2A; 1995.
4. Farmacopea de los Estados Unidos. USP 30. The United States Pharmacopeial Convention. Versión electrónica. New York: Pharm Convention Inc.; 2007.

Recibido: 30 de noviembre de 2010.
Aprobado: 9 de enero de 2011.

MSc. *Caridad Margarita García Peña*. 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: caridadgp@infomed.sld.cu