

Estabilidad de una formulación de zidovudina solución oral 1 mg/mL

Stability of a 1 mg/mL oral solution zidovudine

Caridad Margarita García Peña^I; Iván Morales Lacarrere^{II}; Vivian Martínez Espinosa^{III}

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

^{II}Licenciado en Química. Investigador Auxiliar. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. La Habana, Cuba.

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

RESUMEN

Se realizó la evaluación del desempeño de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución, aplicable al estudio de estabilidad de zidovudina solución oral 1 mg/mL. El método analítico resultó lineal, preciso, específico y exacto en el rango de concentraciones estudiadas. Se desarrolló el estudio de estabilidad de la solución oral de zidovudina 1 mg/mL y se determinó su fecha de vencimiento. El estudio de vida de estante se desarrolló por un periodo de 24 meses a temperatura ambiente; mientras que el de estabilidad acelerada se efectuó sometiendo el producto a la influencia de la humedad y la temperatura; se realizó el análisis durante 3 meses. La formulación cumplió con las especificaciones de calidad descritas en la Farmacopea. Los resultados del estudio de estabilidad por vida de estante después de transcurridos los 24 meses indicaron que el producto mantiene los parámetros que determinan su calidad durante ese tiempo, y en los estudios acelerados no se observó degradación significativa del producto. Se estableció 2 años como fecha de vencimiento en las condiciones señaladas.

Palabras clave: Zidovudina, validación, estudios de estabilidad.

ABSTRACT

The carrying out of a high-performance liquid chromatography analytical method was assessed; applicable to stability study of oral solution zidovudine (1 mg/mL) was made. The analytical method was linear, precise, specific and exact in the study concentrations. The stability study of oral solution zidovudine (1 mg/mL) was conducted determining expiring date. The shelf life study was conducted over 24 months at room temperature; whereas that of accelerated stability was conducted with the product under wet and temperature conditions; analysis was carried out over three months. Formula met quality specifications described in Pharmacopeia. Results from the shelf life study demonstrated that product keeps the parameters determining its quality during that time and in accelerated studies there was not significant product degradation. Under above mentioned conditions two years were established as expiring date.

Key words: Zidovudine, validation, stability studies.

INTRODUCCIÓN

La solución oral de zidovudina 1 mg/ml se indica en el tratamiento de la infección por virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en combinación con otros medicamentos antirretrovirales, en la profilaxis de la transmisión del VIH materno-fetal y en la profilaxis de la infección por VIH por exposición ocupacional.^{1,2}

La cromatografía líquida de alta resolución (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.^{3,4}

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 evaluación del desempeño de un método analítico, según se expresa en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP, 30), son exactitud, precisión, especificidad y linealidad.^{4,5}

La estabilidad de los productos farmacéuticos representa un importante eslabón en el desarrollo y formulación de toda forma terminada. De esta manera se puede definir las condiciones de almacenamiento en el envase propuesto y establecer la vida útil del producto farmacéutico. Estos estudios contemplan la conservación de la potencia, pureza, características organolépticas y su efectividad.⁶

El Centro para el Control Estatal de los Medicamentos (CECMED) exige para el registro de un nuevo medicamento la realización de los estudios de estabilidad.

En el presente estudio se empleó el método reportado en la USP 30, al que se le realizó la evaluación del desempeño de este para su aplicación en el análisis del principio activo en el producto terminado aplicable al control de la calidad y el estudio

de estabilidad, con el objetivo de demostrar la fiabilidad del método reportado en la solución oral de zidovudina de producción nacional.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el desempeño del método de análisis para el estudio de estabilidad del producto terminado y realizar el estudio de estabilidad de una formulación de zidovudina solución oral 1 mg/mL.

MÉTODOS

La sustancia de referencia química de zidovudina, patrón primario, fue suministrado por el grupo de sustancias de referencia del Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), el cual fue analizado por el método cromatográfico establecido para realizar el control de la calidad de la materia prima, con una pureza de 99,1 %. El producto terminado en forma de solución oral, fue elaborado en el Laboratorio de Formas Terminadas del CIDEM, identificado como los lotes 06001, 06002 y 06003, fabricado en mayo de 2006, el cual cumplió con las especificaciones de calidad establecidas para el control de la calidad.

Evaluación del desempeño del método analítico

La evaluación del desempeño se realizó según el método reportado en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP, 30) para la solución oral de zidovudina; se evaluaron los parámetros que más adelante se describen.

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 5 N y hidrólisis básica NaOH 5 N. No se realizó el estudio en otras condiciones drásticas como oxidación, luz y temperatura porque existen estudios anteriores en el que se demostró la estabilidad de este en dichas condiciones.⁷

Para el estudio de la linealidad de la respuesta del detector se preparó una curva de calibración con soluciones patrón de zidovudina en un rango de concentraciones de 60 a 140 µg/mL, que representan del 60 al 140 % de la concentración teórica del principio activo en la solución. Se determinó la ecuación de la recta el coeficiente de correlación, la prueba de significación estadística de significación de la pendiente S_b rel (%) y los coeficiente de variación de los factores de respuesta.

Se evaluó la precisión del método. La repetibilidad se estudió sobre la base de 6 determinaciones; con ellas se determinaron los valores medios, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Se efectuaron valoraciones por 2 analistas en 2 días diferentes para comprobar la precisión intermedia del método; 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.

En el estudio de la exactitud se empleó el método de recuperación, preparando muestras con diferentes niveles de zidovudina que representaban el 80, 100 y 120% de la concentración teórica del principio activo en la solución; según la formulación propuesta, se determinó el % de recuperación y el coeficiente de variación. Se realizó además la prueba de Cochran con vistas a comprobar si la variación de la concentración producía diferencias significativas en los resultados, para una $k= 3$, $n= 3$, 95 % de confianza, y la prueba de la t de Student para determinar diferencias significativas entre la recuperación media y el 100 %.

Estudio de estabilidad

Para el desarrollo de la formulación se empleó como materia prima zidovudina, procedente de la India, fecha de fabricación marzo de 2005, la cual fue analizada siguiendo las especificaciones de calidad descritas en la monografía de la USP 27.

Este estudio se realizó por los métodos de vida de estante y estabilidad acelerada. Se emplearon muestras de los lotes 06001, 06002 y 06002, producidos en el Laboratorio de Formas Líquidas del CIDEM y envasados en frascos de vidrio ámbar, de capacidad máxima 125 mL, clase hidrolítica III, con tapa plástica con anillo de inviolabilidad.

Estabilidad acelerada: en los estudios de estabilidad acelerada, se almacenaron las muestras de los lotes estudiados en un horno a temperatura controlada de 40 °C y 75 % de humedad relativa; se valoraron al inicio, 1, 2, 3 y 6 meses.

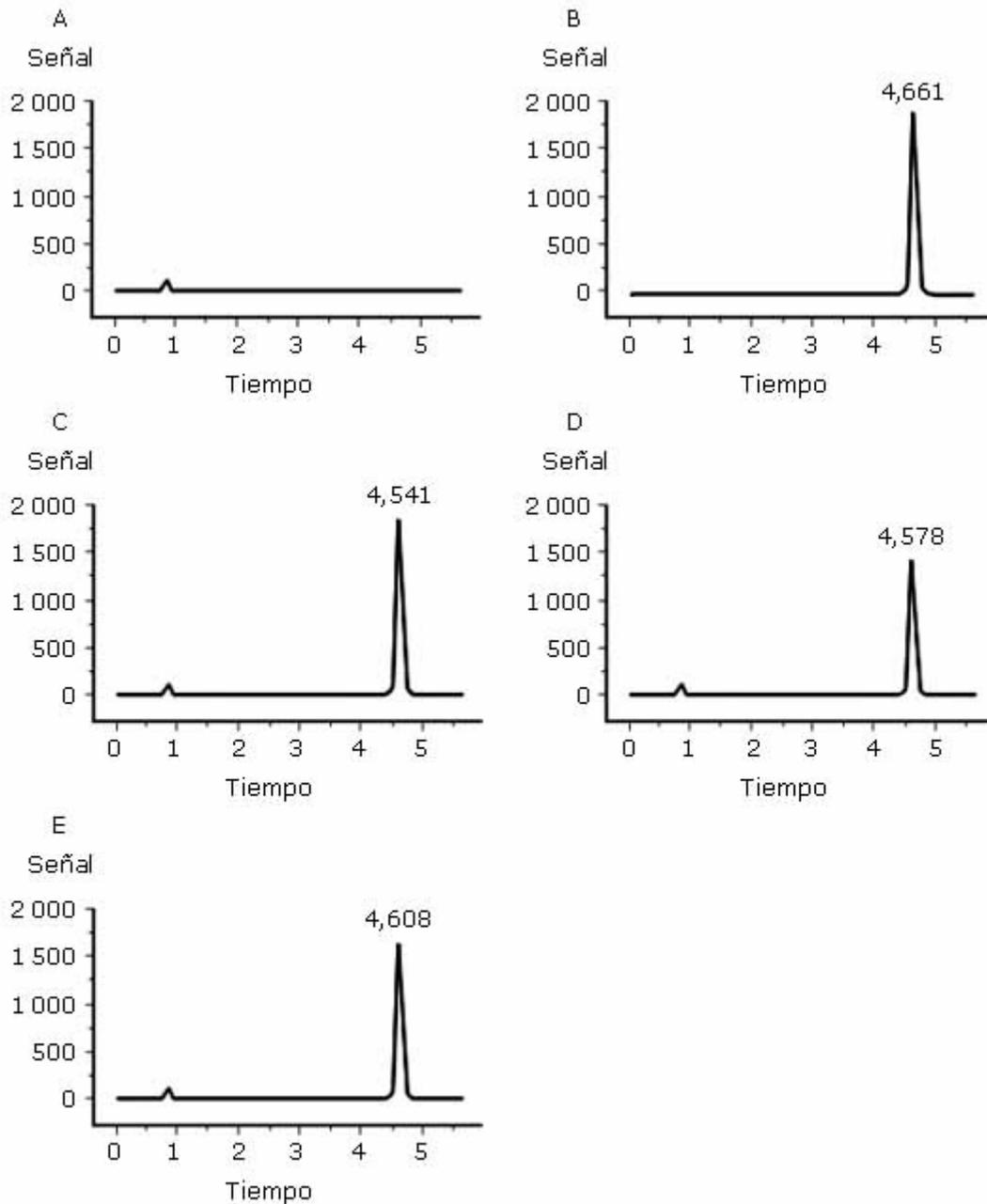
Estabilidad por vida de estante: en el estudio de estabilidad por vida de estante, los lotes estudiados se almacenaron a temperatura ambiente (30 °C) y protegidos de la luz; se valoraron al inicio, a 3, 6, 9, 12, 18 y 24 meses de fabricados.

Estabilidad en frasco en uso: en el estudio de estabilidad de frasco en uso, el lote estudiado se almacenó a temperatura ambiente (30 °C) y protegidos de la luz; se valoraron al inicio, a 6, 12, 18, 24 y 30 días de iniciado el estudio.

RESULTADOS

Evaluación del desempeño del método analítico

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 de referencias y de la muestra de producto terminado, 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 y hidrólisis ácida, que se observan en los cromatogramas, solo se pudo apreciar una ligera degradación por la disminución de la altura de los picos, sin la aparición de pequeños picos secundarios como posibles productos de degradación.



A: muestra placebo; B: solución de referencia química; C: muestra; D: muestra sometida a hidrólisis básica; E: muestra sometida a hidrólisis ácida.

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; el coeficiente de regresión lineal fue de 0,9991 y el coeficiente de variación del factor de respuesta resultó igual a 1,00 %.

Tabla 1. Estudio de linealidad

Parámetros	Resultados	Límites
Ecuación de la recta	$y = 15631,82798 x - 8879,1284$	$y = bx + a$
Coefficiente de regresión lineal	$r = 0,9991$	$r \geq 0,990$
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	$S_{b_{rel}} (\%) = 1,25$	$S_{b_{rel}} (\%) \leq 2 \%$
Coefficiente de variación de los factores de respuesta		
Coefficiente de variación del factor de respuesta	$CV_F = 1,00 \%$	$CV_F \leq 5 \%$

y: área; x: concentración; b: pendiente; a: intercepto; r: coeficiente de regresión lineal; r²: coeficiente de determinación; S_{b_{rel}}: desviación estándar relativa de la pendiente; CV_F: coeficiente de variación del factor de respuesta.

Los resultados del estudio de precisión del método aparecen reportados en la tabla 2. En el estudio de repetibilidad realizado, la media obtenida fue de 96,23 % y el coeficiente de variación fue de 0,64 %, mientras que los valores de F calculadas y los valores de t calculadas fueron menores que los valores tabulados, para un 95 % de confianza, para cada uno de los niveles estudiados.

Tabla 2. Estudio de la precisión intermedia del método analítico

Analista 1		Analista 2	
Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
96,9 %	97,1 %	97,2 %	96,7 %
95,2 %	95,8 %	96,8 %	96,1 %
95,8 %	96,1 %	97,0 %	95,7 %
96,2 %	96,3 %	95,3 %	97,0 %
97,0 %	95,4 %	96,7 %	96,8 %
96,3 %	96,5 %	96,6 %	96,0 %
X _{media} = 96,23 %	X _{media} = 96,20 %	X _{media} = 96,60 %	X _{media} = 96,38 %
CV = 0,64 %	CV = 0,56 %	CV = 0,64 %	CV = 0,49 %
F _{cal} = 1,52 F _{tab} (10,10/0,05) = 2,97 t _{cal} = 0,75 t _{tab} (22/0,05) = 2,07			

t_{cal}: t calculada; F_{cal}: F calculada; t_{tab}: t tabulada; F_{tab}: F tabulada.

La recuperación media en el estudio de exactitud fue de 99,77 % y los valores de t calculada (0,78) y de G calculada (0,3115) fueron menores que los valores tabulados, para un 95 % de confianza; t tabulada 2,57 y G tabulada 0,9750. Los valores de coeficientes de variación que se obtuvieron para los niveles de concentración estudiados que representaban el 80, 100 y 120% de la concentración teórica del principio activo en la solución fueron: 1,14; 0,98 y 1,42 %, respectivamente.

Estudio de estabilidad

Los resultados del estudio de estabilidad acelerada a 40 °C y 75 % de humedad relativa (HR), correspondiente a los lotes 06001, 06002 y 06003, se reportan en la tabla 3; se demostró que el producto terminado no presenta cambios significativos.

Tabla 3. Estudio de estabilidad acelerada a 40 °C y 75 % de HR

Parámetros	Tiempo (meses)	Lotes			Límites
		06001	06002	06003	
Características organolépticas	0	Responde	Responde	Responde	Líquido transparente, libre de partículas en suspensión, con olor característico
	1	Responde	Responde	Responde	
	2	Responde	Responde	Responde	
	3	Responde	Responde	Responde	
	6	Responde	Responde	Responde	
pH	0	3,37 ± 0,05	3,44 ± 0,14	3,35 ± 0,07	3,0-4,0
	1	3,57 ± 0,12	3,59 ± 0,07	3,56 ± 0,09	
	2	3,77 ± 0,08	3,83 ± 0,05	3,81 ± 0,06	
	3	3,67 ± 0,10	3,73 ± 0,13	3,75 ± 0,15	
	6	3,68 ± 0,15	3,69 ± 0,19	3,70 ± 0,10	
Valoración (%)	0	104,1 ± 0,45	103,3 ± 0,40	104,3 ± 0,26	90,0-110,0 %
	1	102,7 ± 0,23	101,8 ± 0,32	102,9 ± 0,34	
	2	101,9 ± 0,12	100,9 ± 0,26	102,1 ± 0,42	
	3	101,0 ± 0,16	100,3 ± 0,37	101,7 ± 0,26	
	6	99,5 ± 0,37	98,9 ± 0,34	99,8 ± 0,27	

Los valores de pH (n= 3) y valoración (n= 3) se representan como valor medio ± desviación estándar relativa. La valoración se realizó por CLAR. Los límites tomados fueron los establecidos en la USP 30, 2007.

Los resultados del estudio de vida de estante, al inicio, 3, 6, 9, 12, 18 y 24 meses, se muestran en la tabla 4; se observó que el producto terminado cumple con las especificaciones de calidad durante el estudio.

Tabla 4. Estudio de vida de estante

Parámetros	Tiempo (meses)	Lotes		
		06001	06002	06003
Características organolépticas	0	Responde	Responde	Responde
	3	Responde	Responde	Responde
	6	Responde	Responde	Responde
	9	Responde	Responde	Responde
	12	Responde	Responde	Responde
	18	Responde	Responde	Responde
	24	Responde	Responde	Responde
pH	0	3,37 ± 0,04	3,44 ± 0,14	3,35 ± 0,10
	3	3,62 ± 0,10	3,60 ± 0,16	3,59 ± 0,16
	6	3,59 ± 0,06	3,58 ± 0,18	3,55 ± 0,17
	9	3,65 ± 0,09	3,67 ± 0,16	3,66 ± 0,09
	12	3,76 ± 0,12	3,73 ± 0,13	3,73 ± 0,12
	18	3,45 ± 0,14	3,48 ± 0,10	3,52 ± 0,10
	24	3,39 ± 0,06	3,43 ± 0,07	3,69 ± 0,16
Valoración (%)	0	104,1 ± 0,45	103,3 ± 0,46	104,3 ± 0,18
	3	103,8 ± 0,32	103,0 ± 0,41	103,9 ± 0,27
	6	103,3 ± 0,29	101,8 ± 0,36	102,5 ± 0,29
	9	103,0 ± 0,21	101,4 ± 0,32	101,9 ± 0,24
	12	102,7 ± 0,32	101,4 ± 0,36	101,7 ± 0,37
	18	101,3 ± 0,41	100,7 ± 0,21	100,6 ± 0,38
	24	99,8 ± 0,38	99,9 ± 0,26	99,9 ± 0,33
Productos de degradación (%)	0	Inapreciables	Inapreciables	Inapreciables
	3	Inapreciables	Inapreciables	Inapreciables
	6	Inapreciables	Inapreciables	Inapreciables
	9	Inapreciables	Inapreciables	Inapreciables
	12	Inapreciables	Inapreciables	Inapreciables
	18	Inapreciables	Inapreciables	Inapreciables
	24	Inapreciables	Inapreciables	Inapreciables
Conteo microbiológico	0	Cumple	Cumple	Cumple
	24	Cumple	Cumple	Cumple

Los valores de pH (n= 3) y valoración (n= 3) se representan como valor medio ± desviación estándar relativa. La valoración se realizó por CLAR. Los límites tomados fueron los establecidos en la USP 30, 2007. El conteo microbiológico se realizó por el método general reportado en la USP 30, 2007.

Los resultados del estudio de frasco en uso, se reportan en la tabla 5; se demostró que el producto se mantiene estable durante su uso.

Tabla 5. Estudio de frasco en uso

Parámetros	Tiempo (días)					
	0	6	12	18	24	30
Características organolépticas	Responde	Responde	Responde	Responde	Responde	Responde
pH	3,37 ± 0,12	3,42 ± 0,05	3,35 ± 0,16	3,29 ± 0,14	3,73 ± 0,19	3,79 ± 0,16
Valoración (%)	104,1 ± 0,42	104,0 ± 0,33	103,9 ± 0,28	103,8 ± 0,31	103,5 ± 0,40	103,5 ± 0,37
Productos de degradación (%)	Inapreciables	-	-	-	-	Inapreciables
Conteo microbiológico	Cumple	-	-	-	-	Cumple

Los valores de pH (n= 3) y valoración (n= 3) se representan como valor medio ± desviación estándar relativa. La valoración se realizó por CLAR. Los límites tomados fueron los establecidos en la USP 30, 2007. El conteo microbiológico se realizó por el método general reportado en la USP 30, 2007.

DISCUSIÓN

Evaluación del desempeño del método analítico

Los resultados obtenidos en el estudio de especificidad del método demostraron 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 del principio activo. En cuanto a las muestras sometidas a condiciones drásticas no se observó la aparición de picos secundarios, atribuibles a un posible producto de degradación, no hubo interferencia en la determinación del principio activo.

Los resultados de los estudios de linealidad mostraron valores superiores a los exigidos para los coeficiente de regresión y de determinación de 0,99 y 0,98 respectivamente; se demostró 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, considerados estimadores puntuales que permiten caracterizar la variabilidad. El valor obtenido del coeficiente de variación del factor de respuesta demostró que existe variabilidad en la relación respuesta y concentración para cada nivel evaluado. Se demostró con los resultados obtenidos la linealidad del método propuesto.

En el estudio de la repetibilidad realizado a una misma muestra, por el mismo analista, el mismo día, a través de 6 réplicas, se obtuvo un coeficiente de variación adecuado, lo que demostró la buena precisión del método, observándose una variabilidad de los resultados dentro de los límites establecidos para los métodos cromatográficos: $CV \leq 2,0\%$.

Los valores que se obtuvieron en los estudios de precisión intermedia, de las pruebas de Fischer y de la t de Student, para el estudio de la precisión intermedia demostraron que no existen diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por los analistas en diferentes días para un 95 % de confianza, ya que el valor de F calculada es menor que la F tabulada; estos resultados permitieron establecer la similitud de las precisiones. Al realizar la prueba de la t de Student el valor calculado resultó menor que el tabulado, para un 95 % de confianza, lo que demostró 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 menores 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 fueron equivalentes, lo que indica que la concentración no influye en la variabilidad de estos. En los resultados obtenidos de la prueba de significación entre la recuperación media y el 100,0 % de recuperación, el coeficiente de variación fue 0,72 %, el valor de t calculada resultó menor que la t tabulada.

Estudio de estabilidad

El conjunto de los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad acelerada a 40 °C y 75 % de humedad relativa, demostraron la estabilidad del producto. Se demostró la estabilidad térmica del producto ya que después de transcurridos 6 meses se mantuvo la concentración conforme con los límites establecidos en las especificaciones de calidad del producto terminado.

En el estudio de vida de estante realizado, no se observaron cambios en los aspectos organolépticos, ni en el pH y tampoco en la concentración del principio activo determinado en la valoración durante el tiempo de almacenamiento estudiado, por lo que se evidenció la estabilidad del producto terminado por un periodo de 2 años, ya que el producto se mantuvo estable en el tiempo de duración del estudio.

Los resultados obtenidos en el estudio de frasco en uso del producto terminado, se encontraron dentro de los límites establecidos para el producto terminado, por lo que se demostró la estabilidad del producto en las condiciones de uso de este.

En conclusión, el método analítico reportado en la USP 30, evaluado para su aplicación en la solución oral de zidovudina 1 mg/mL de producción nacional, resultó específico, lineal, exacto y preciso en el rango de concentraciones estudiadas.

Se demostró la estabilidad física, química y microbiológica del producto por espacio de 24 meses a temperatura ambiente, ya que en todos los casos los resultados obtenidos se encontraron dentro de los límites establecidos en las especificaciones de calidad de la solución oral de zidovudina 1 mg/mL.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Goodman A, Gilman A. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Tomo II. 3ra ed. La Habana: Editorial Científico Técnica; 1994. p. 4665. (Edición Revolucionaria).

2. PDR. Physician´s Desk Reference. 57 ed. New York: Inc at Montuale; 2003. p. 2198.
3. Dierksneier G. Métodos cromatograficos. La Habana: Ed. Científico-Técnica; 2005. p. 1-4, 256-412.
4. International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedures. Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Geneva: ICH-Q2A; 1995.
5. Farmacopea de los Estados Unidos. USP 30. The United States Pharmacopeial Convention. Estados Unidos de América NF-25. 2007. 30 ed. Rockville: Mack Printing; 2007.
6. Regulación No. 16-2000: Buenas Prácticas de Fabricación de Productos Farmacéuticos. La Habana: Centro Estatal para el Control de Medicamentos (CECMED); 2000.
7. García Peña CM, León Rodríguez R, Fernández Cervera M, Ibáñez Calvo S, Martínez Espinosa V. Evaluación de desempeño del método de ensayo de disolución para tabletas de zidovudina 300 mg producidas en Cuba. Rev Cubana Farm [Internet]. 2010 Sep [citado 2010 Feb 05]; 44(3): 297-305. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152010000300003&lng=es

Recibido: 30 de noviembre de 2010.

Aprobado: 9 de enero de 2011.

Caridad Margarita García Peña. Yaily Lazo Roblejo. 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