

**Validación del método analítico para la cuantificación de ciclosporina A en
forma de dispersión sólida**

MSc. Suslebys Salomón Izquierdo^I, Lic. Jacqueline Aylema Romero Díaz^{II},
Tec. Marisleydi Begue David^{III}

- I. Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. MSc en Tecnología y Control de Medicamentos. Aspirante a Investigador. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). La Habana, Cuba. E-mail: suslebyssi@infomed.sld.cu
- II. Licenciada en Bioquímica. Aspirante a Investigador. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos.
- III. Técnico en Farmacia Dispensarial. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos.

Dirección electrónica: suslebyssi@infomed.sld.cu

Institución: Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. La Habana, Cuba

RESUMEN

Fundamentación: La ciclosporina A, es el principio activo más importante en la terapia inmunosupresiva, pero su hidrofobicidad dificulta el diseño de formulaciones de adecuada biodisponibilidad tras una administración oral. Se desarrolló un procedimiento de obtención de una nueva materia prima conteniendo ciclosporina A como dispersión sólida de elevada solubilidad acuosa. No existiendo en la literatura oficial ningún método para la cuantificación de la ciclosporina A en la dispersión sólida.

Objetivos: Validar un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución para cuantificar la ciclosporina A en la dispersión sólida.

Métodos: Los parámetros fueron: Linealidad, exactitud, precisión y especificidad. Se empleó una columna C-18 de 25 x 4 cm, con detección UV a 210 nm, fase móvil compuesta por agua, acetonitrilo, terc-butil metil éter y ácido fosfórico (520:430:50:1) realizando la cuantificación frente a una muestra de referencia, suministrada por el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos, por el método del estándar externo.

Resultados: La curva de calibración se realizó en el intervalo de 60 al 140 %, siendo lineal con coeficiente de correlación de 0,9986; la prueba estadística para el intercepto y la pendiente se consideró no significativa. Se obtuvo un recobrado del 99,86 % en el intervalo de concentraciones estudiado, las pruebas de Cochran y Student resultaron no significativas. El coeficiente de variación en la repetibilidad fue 0,49 % para las 6 réplicas, en la precisión intermedia las pruebas de Fischer y Student resultaron no significativas. No se observó interferencia de los excipientes en la zona de elusión, demostrándose la especificidad.

Conclusiones: El método resultó lineal, preciso, específico y exacto en el intervalo de concentraciones estudiadas.

Palabras clave: ciclosporina A, dispersión sólida, cromatografía líquida de alta resolución, validación.

INTRODUCCIÓN

La ciclosporina A (CsA) es un polipéptido extraído del hongo *Tolypocladium inflatum* Gams, insoluble en agua, muy soluble en disolventes orgánicos y lípidos^{1, 2}. Es el principio activo más importante de la terapia inmunosupresiva en los trasplantes de órganos sólidos, no obstante, su gran hidrofobicidad, hace que se dificulte el diseño de preparaciones farmacéuticas, que exhiban una absorción satisfactoria en la circulación sistémica después de una administración oral.^{3, 4, 5}

Una de las estrategias más importantes de la industria farmacéutica en la actualidad es el desarrollo de técnicas de solubilización de principios activos lipofílicos, para el aumento de su biodisponibilidad oral.^{6, 7}. Entre ellas la elaboración de dispersiones sólidas (DS) es una de las estrategias de solubilización más exitosas para el aumento de la solubilidad de ingredientes farmacéuticos activos.^{8, 9}

Se desarrolló un procedimiento de obtención de una nueva materia prima en forma dispersión sólida de ciclosporina A¹⁰ con mayor valor de transmitancia en agua que la Sandimmun Neoral[®] microemulsión preconcentrada existente en el mercado cuya absorción oral, todavía es incompleta y variable.¹¹

La literatura reporta métodos analíticos por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), para la cuantificación de la CsA como materia prima, y en las formulaciones líquidas orales y en tableta, no reportándose métodos por CLAR para su cuantificación en forma de DS.¹²

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.^{13, 14}

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.

Entre 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.^{12, 15}

El presente trabajo tiene como objetivo validar un método analítico para la cuantificación de la CsA en la dispersión sólida.

MÉTODOS

Se utilizó un material químico de referencia USP (Lote IOF343) de ciclosporina A de pureza de 98,7%, muestras de la dispersión sólida elaborada en el Departamento de Materias Primas del Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM).

Se empleó el método descrito en la USP 33 para la cuantificación de CsA materia prima.¹²

Se utilizó un cromatógrafo líquido KNAUER compuesto con detector UV ajustado a 210 nm y un volumen de inyección de 20 µL. La separación se realizó isocráticamente empleándose una columna C - 18 (4 mm x 25 cm), a una temperatura de 80 °C con un flujo de 1,2 mL/min, para lo cual se utilizó una fase móvil compuesta por una mezcla de agua, acetonitrilo, terc-butil metil éter y ácido fosfórico (520:430:50:1) y como diluyente una mezcla acetonitrilo y agua en relación 1:1. Todos los reactivos fueron puros para análisis.

Para el análisis se disolvió una cantidad exacta de la sustancia de referencia química en diluyente de modo que se obtuviera una solución con una concentración final de 1.25 mg/mL.

Para el análisis de las muestras se pesaron exactamente 31,25 mg de muestra y se trasvasó a un frasco volumétrico de 25 mL adicionándose diluyente, se aplicó ultrasonido hasta dilución y se completó volumen con diluyente (concentración de trabajo 1,25 mg/mL)

Validación del método analítico

La validación fue realizada según la categoría I (USP-33) 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, en la que se evaluaron los parámetros que a continuación se describen:^{12, 16}

Especificidad: Se analizaron la sustancia de referencia de CsA, las muestras de DS, el placebo de la DS, y muestras de DS sometidas a condiciones drásticas de oxidación (H₂O₂), hidrólisis ácida (HCl 3N), básica (NaOH 3N) a temperatura

ambiente y exposición a la luz solar por 4 días. Como criterio de aceptación, se acordó que no debían obtenerse señales del placebo y de los productos de degradación en la zona de elusión del principio activo a cuantificar. El área bajo la curva del patrón, así como el tiempo de retención de este y del principio activo a cuantificar, en el producto terminado deben ser similares.

Linealidad: Se realizó el modelo de 3 determinaciones para 5 concentraciones diferentes: 60, 80, 100, 120, y 140 %. Se determinaron las ecuaciones de las rectas, los coeficientes de correlación, las pruebas de significación estadística, de significación de la pendiente y los coeficientes de variación de los factores de respuesta

Precisión: Se realizaron los estudios de repetibilidad y de reproducibilidad trabajando a partir de una homogénea común y realizándose el análisis como mínimo por triplicado. Para el caso de la repetibilidad se trabajó sobre la base de seis determinaciones y en el estudio de precisión intermedia se compararon valoraciones de dos analistas en tres días diferentes, a tres niveles de concentración, que representaban el 80, 100 y 120 % de la concentración teórica. A los datos obtenidos se les aplicaron la prueba de t de Student y la prueba de Fisher con el objetivo de determinar si existían diferencias significativas entre las medias obtenidas y entre las precisiones alcanzadas por los analistas respectivamente, se compararon los valores experimentales con los calculados para un límite de confianza de un 95% de la media.

Exactitud: Se realizó el modelo de 3 réplicas, para 3 concentraciones diferentes: 80, 100, 120 %, determinándose el % de recuperación, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Se determinaron además las pruebas de Cochran con vistas a comprobar si la variación de la concentración producía diferencias significativas en los resultados y las pruebas de t de Student para la determinación de las diferencias significativas entre la recuperación media y el 100 %.

RESULTADOS

La figura 1 muestra los resultados obtenidos del estudio de especificidad del método. En el cromatograma correspondiente a la dispersión sólida placebo (B), no se obtuvo ninguna señal en la zona de interés al ser comparado con la señal obtenida para la solución estándar de referencia (A) y de la dispersión sólida (G), 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 las condiciones drásticas de oxidación, luz solar, hidrólisis ácida e hidrólisis básica (cromatogramas C, D, E, F se aprecia degradación por la disminución de la altura del pico del principio activo, no observándose picos adicionales en la zona de elusión del producto principal.

En la tabla 1 se reportan los resultados del estudio de la linealidad del sistema, donde los coeficientes de regresión y de determinación fueron de 0,9986 y 0,9972 respectivamente. El coeficiente de variación del factor de respuesta resultó igual a 1,55 %. En la figura 2 se muestra la curva de calibración correspondiente.

En cuanto al estudio de precisión, el resultado del estudio de repetibilidad del sistema (tabla 2) presenta una media de 99,93 y un coeficiente de variación de 0,49 %. Mientras que los valores de F y t calculadas fueron menores que los valores tabulados para cada uno de los niveles estudiados según los resultados del estudio de precisión intermedia (tabla 3), donde los valores tabulados para la prueba de Fischer fueron por analistas 3, 44 y por días 5,05, para la prueba de la t de Student fueron por analistas 2,12 y por días 2, 22 para un 95 % de confianza.

Los resultados estadísticos del estudio de exactitud se muestran en la tabla 4, siendo la recuperación media de 99,86 %, el valor de t calculada (2,181) y de G calculada (0,63) resultaron menores que los valores tabulados, t tabulada 2.306 para un 95 % de confianza y G tabulada 0.797 para un 95 % de confianza, $k= 3$ y $n= 3$.

DISCUSIÓN

Los resultados del estudio de especificidad (figura 1) 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. Demostrándose por tanto 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. 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 %.

El método fue exacto ya que el recobrado medio no excedió el límite de 92,0 - 102,0 %. 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. Por su parte, la prueba de la t de Student corroboró la exactitud, ya que la t obtenida fue inferior a la tabulada, por lo que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre el recobrado medio y el 100 %.

El método analítico, validado por CLAR, para la cuantificación de la ciclosporina A en la dispersión sólida resultó ser lineal, preciso, exacto y específico, en el intervalo de concentraciones estudiadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Soy D, Brunet M, Roca M, Codina C, Marino E. L, Ribas J. Importancia clínica de los metabolitos de ciclosporina A (CsA) en trasplantes de órganos. Determinación analítica por cromatografía líquida de alta eficacia. *Farm Hos* 1995; 19 (3): 155-160.
2. Faulds D, Goa K, Benfield P. Cyclosporin: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in immunoregulatory disorders. *Drugs* 1993; 45: 953-1040.
3. Talal N. Cyclosporine as an immunosuppressive agent for autoimmune disease: theoretical concepts and therapeutic strategies. *Transplant Proc.* 1988 Jun; 20(3 Suppl 4):11-5.
4. Fraga E, Barrera P, de la Mata M. Inmunosupresión en el trasplante hepático. *Gastroenterol Hepatol* 2007; 30(1):70-7.
5. Stuchlik M, Andrysek T, Jegorov A, Husek A, Matha V, Stuchlik J, et al. Cyclosporin formulation. United States patent US patent 6106860. 2000.
6. El-Badry M, Fetih G, Fathy M. Improvement of solubility and dissolution rate of indomethacin by solid dispersions in Gelucire 50/13 and PEG4000. *Saudi Pharmaceutical Journal* 2009;17: 217-25.
7. Karanth H, Shenoy VS, Murthy RR. Industrially feasible alternative approaches in the manufacture of solid dispersions: a technical report. *AAPS PharmSciTech* 2006;7(4):87.
8. Vasconcelos T, Sarmiento B, Costa P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discov Today* 2007 Dec; 12(23-24):1068-75.
9. Dhirendra K, Lewis S, Udupa N, Atin K. Solid dispersions: a review. *Pak J Pharm Sci* 2009 Apr; 22(2):234-46.
10. Salomón Izquierdo Suslebys. Diseño de un proceso de obtención de una dispersión sólida de ciclosporina A mediante secado por atomización (tesis). Instituto de Farmacia y Alimentos. 2011.

11. Bernard CS, inventor; Solid Pharmaceutical compositions comprising a cyclosporine and an anionic surfactant. United States patent US. 6,197,335 B1. 2001.
12. Farmacopea de los Estados Unidos. USP 33 NF 28. The United States Pharmacopeia. Versión electrónica (CD). 2010.
13. Dierksneier G. Métodos cromatograficos. La Habana: Ed. Científico-Técnica; 2005. p. 1-4, 256-412.
14. Guidance for Industry. Analytical Procedures and Methods Validation Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation. New York: FDA/Center For Drug Evaluation and Research; 2001.
15. International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedures. Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals For Human Use. Geneva: ICH-Q2A; 1995.
16. Regulación No. 41-2007: Validación de métodos analíticos. La Habana: Centro Estatal para el Control de Medicamentos (CECMED); 2007.

ANEXOS

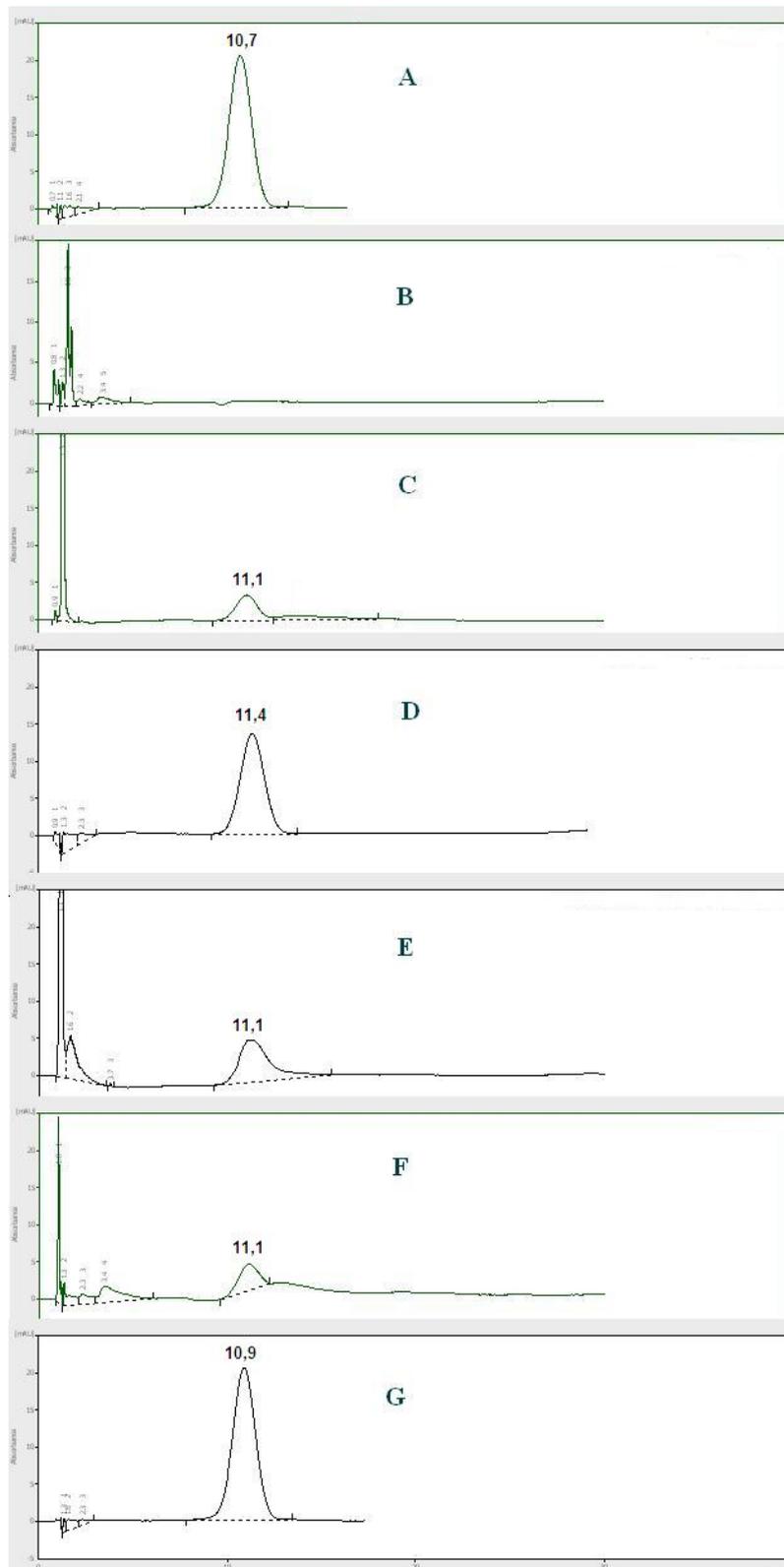


Figura 1. Resultados del estudio de especificidad del método. A) Cromatograma de la sustancia de referencia, B) Cromatograma de la dispersión sólida placebo. C)

Cromatograma de la dispersión sólida a oxidación, D) Cromatograma de la dispersión sólida sometida a la luz. E) Cromatograma de la dispersión sólida sometida a hidrólisis ácida, F) Cromatograma de la dispersión sólida sometida a hidrólisis básica. G) Cromatograma de la dispersión sólida.

Tabla 1. Resultados del estudio de linealidad

Parámetros	Resultados	Límites
Ecuación de la recta	$Y = 0,227995 X - 0.0166$	$Y = bX + a$
Coefficiente de regresión lineal	$r = 0,9986$	$r \geq 0,990$
Coefficiente de determinación	$r^2 = 0,9972$	$r^2 \geq 0,980$
SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA DE LA VARIANZA DE LA PENDIENTE (b)		
Desviación estándar relativa de la pendiente	$Sb \text{ rel}(\%) = 1.89$	$Sb \text{ rel}(\%) \leq 2\%$
COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE LOS FACTORES DE RESPUESTA		
Coefficiente de variación del factor de respuesta	$C.V_F = 1,55\%$	$C.V_F \leq 5\%$
ENSAYO DE PROPORCIONALIDAD		
Intervalo de confianza de la pendiente, $a \pm t_{Sa}$	1,317; -0,985	Debe de incluir al cero para $P = 0,05$

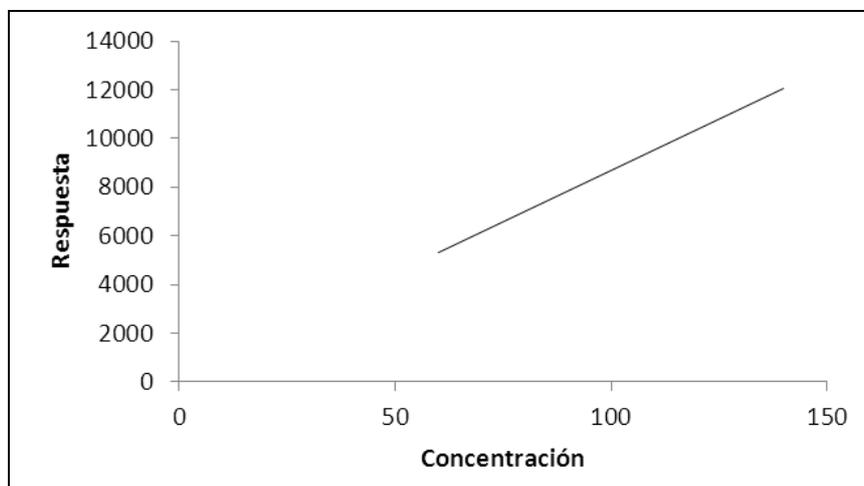


Figura 2. Curva de calibración del estudio de linealidad

Tabla 2. Resultados del estudio de repetibilidad del sistema

Réplicas	ciclosporina A (%)
1	100,00
2	100,20
3	100,36
4	99,85
5	100,15
6	98,99
X media = 99,93	
CV = 0,49 %	

Tabla 3. Resultados del estudio de precisión intermedia

Niveles	Analista 1 (%)			Analista 2 (%)		
	Primer día	Segundo día	Tercer día	Primer día	Segundo día	Tercer día
80 %	78,98	78,08	79,01	78,54	78,9	79,3
	78,99	78,68	78,87	78,25	79,1	78,2
	78,09	79,12	78,65	79,03	78,56	79,11
100 %	99,6	98,8	99,3	98,75	99,3	99,25
	98,6	99,01	99,01	98,80	98,65	98,9
	99,30	98,76	98,97	98,60	99,35	99,8
120 %	121,15	119,9	119,99	121,05	120,5	120,3
	120,39	120,65	120,65	120,80	120,6	120,2
	121,0	120,89	120,47	120,50	120,5	121,01
Prueba de Fischer						
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 %	1,95	80	2,93	2,91	3,60	
100 %	1,25	100	0,10	4,09	3,07	
120%	2.83	120	3,49	2,99	2,27	
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 %	0,36	80	0,45	1,06	0,03	
100 %	0,04	100	1,35	1,30	0,22	
120 %	0,25	120	1,46	0,36	1,78	
Coefficiente de variación						
Niveles		Analista 1		Analista 2		Límites
80 %		0,50		0,35		CV ≤ 2,0 %
100 %		0,32		0,35		
120 %		0,35		0,21		

Tabla 4. Análisis estadístico del estudio de exactitud

Niveles	Recuperación (%)	Resultados	Límites
80%	99,91	R media = 99,86 % t calc. = 2,181 t tab. = 2,306 G calc. = 0,63 G tab. = 0,797	98,0 – 102,0 % t exp. ≤ t tab.
	99,96		
	99,96		
100%	99,63		G exp. ≤ G tab.
	99,67		
	99,73		
120%	99,97		
	99,94		
	100,00		