

ARTÍCULOS ORIGINALES

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE VALORACIÓN PARA OSELTAMIVIR EN CÁPSULAS Y POLVO PARA SUSPENSIÓN ORAL

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF OSELTAMIVIR IN CAPSULES AND POWDER FOR ORAL SUSPENSION

MELINA ASSALONE,¹ RAQUEL SANTISTEBAN,¹ CHRISTIAN RABAHIA,¹ JESSICA BERTINATTO,¹ LEANDRO ITHURALDE,¹ OLGA GRUC,¹ ALICIA LARRINAGA,¹ MARTA SPINETTO,¹ CARLOS CHIALE²

RESUMEN. INTRODUCCIÓN: la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró la pandemia de gripe A H1N1 en 2009. La autoridad sanitaria argentina promovió el desarrollo y validación de un método de control de calidad de productos farmacéuticos que contenían oseltamivir como principio activo. OBJETIVO: Desarrollar y validar un método de valoración para oseltamivir en las formas farmacéuticas de cápsulas y polvo para suspensión oral. MÉTODOS: La valoración de oseltamivir fue realizada mediante cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE), con elusión isocrática a una temperatura de 50°C, columna Phenomenex Luna RP-8, solución reguladora de acetato pH 5,39 y metanol como fase móvil. La detección se realizó con detector de arreglo de diodos a 230 nm. El método fue validado mediante la evaluación de especificidad, retención en filtros, estabilidad de las soluciones, linealidad, exactitud, precisión y robustez. RESULTADOS: Se desarrolló y validó un método por CLAE para la valoración de oseltamivir, el cual fue aplicado con resultados satisfactorios en el análisis de 11 especialidades medicinales de laboratorios nacionales e internacionales. CONCLUSIONES: El método desarrollado puede aplicarse para el control de todos los productos del mercado argentino en sus dos formas farmacéuticas.

ABSTRACT. INTRODUCTION: The World Health Organization (WHO) declared the pandemic influenza A H1N1 virus infection in 2009. Argentine health authorities promoted the development and validation of a quality control method for pharmaceutical products containing oseltamivir as active ingredient. OBJECTIVE: To develop and validate a method for oseltamivir quantitative determination in the pharmaceutical dosage forms of capsules and powder for oral suspension. METHODS: The determination of oseltamivir was performed using a high performance liquid chromatography (HPLC) method under an isocratic elution, at a temperature of 50°C with a RP-8 Phenomenex Luna column and a mobile phase containing acetate buffer pH 5.39 and methanol. The detection was performed at 230nm with a diode array detector. The method was validated by evaluating specificity, filter retention, solution stability, linearity, accuracy, precision and robustness. RESULTS: An HPLC method was developed and validated for quantitative determination of oseltamivir, and it was successfully applied in the analysis of eleven medical products from national and international laboratories. CONCLUSIONS: The method developed can be applied for control of all products on the Argentine market in its two pharmaceutical forms.

PALABRAS CLAVE: Oseltamivir - Cápsulas - Polvo para suspensión oral - Valoración - Validación

KEY WORDS: Oseltamivir - Capsules - Powder for oral suspension - Quantitative determination - Validation

¹ Instituto Nacional de Medicamentos, Buenos Aires, Argentina.

² Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, Buenos Aires, Argentina.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, Ministerio de Salud de la Nación, Argentina.

FECHA DE RECEPCIÓN: 21 de enero de 2011

FECHA DE ACEPTACIÓN: 10 de mayo de 2011

CORRESPONDENCIA A:

Marta Spinetto

Correo electrónico: mspinet@anmat.gov.ar

INTRODUCCIÓN

El Ministerio de Salud de la Nación de Argentina anunció la emergencia sanitaria en 2009 debido a la pandemia de gripe A declarada por la OMS.¹

El fosfato de oseltamivir [fosfato de (3R,4R,5S)-4-acetamido-5-amino-3-(1-etilpropoxi)-1-ciclohexeno-1-carboxilato de etilo (1:1)] Número de CAS 196618-13-0; pKa 7,75² es un profármaco antiviral selectivo contra las dos variedades del virus de la influenza, A y B. Este compuesto constituye la primera opción terapéutica en la profilaxis y tratamiento de la gripe A H1N1.^{3, 4} Dado que no existía un método oficial para controlar la calidad de los productos que contienen oseltamivir y que están disponibles en el mercado argentino (cápsulas y polvo para suspensión oral de 75 mg y 12 mg/ml, respectivamente⁵), la autoridad sanitaria argentina promovió el desarrollo y la validación de un método analítico para determinar el principio activo en las formas farmacéuticas antes mencionadas. La metodología desarrollada se

validó mediante la evaluación de los siguientes atributos: especificidad, retención en filtros, estabilidad de las soluciones, linealidad, exactitud, precisión y robustez.^{6, 7, 8, 9, 10}

El método desarrollado y validado de valoración para oseltamivir, en las formas farmacéuticas de cápsulas y polvo para suspensión oral, fue aplicado en el análisis de las especialidades medicinales disponibles en el mercado argentino.

MATERIALES Y MÉTODOS

PRODUCTOS FARMACÉUTICOS Y REACTIVOS QUÍMICOS

En los procedimientos desarrollados se empleó: metanol calidad cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) y acetato de sodio anhidro, ácido acético glacial, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico calidad para análisis y agua destilada. Los estándares de trabajo, muestras, placebos y excipientes empleados, los cuales se encuentran archivados en el Servicio de Estabilidad de Droga y Medicamentos del Instituto Nacional de Medicamentos (INAME), fueron aportados por los laboratorios nacionales titulares de los productos comercializados al momento del estudio.

EQUIPOS

La determinación del oseltamivir se realizó con:

- Cromatógrafo líquido de alta eficacia (CLAE) Shimadzu, equipado con un inyector de muestras automático, un detector UV-VIS con arreglo de diodos (PDA) modelo SPD-10A, un horno para mantener la temperatura de la columna, un sistema automático de integración y registros de datos y software Class VP 2.
- pHmetro Mettler-Toledo modelo MT230.

PARTE EXPERIMENTAL

ESTANDARIZACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Luego de diversas pruebas realizadas en la etapa de desarrollo, se seleccionó para el análisis cromatográfico una columna Phenomenex Luna 5u C8 (2) 100 A fase reversa, de 5 µm y 250 x 4,6 mm mantenida a una temperatura de 50°C. El detector se mantuvo a longitud de onda fija a 230 nm. La fase móvil empleada fue solución reguladora de acetato (acetato de sodio – ácido acético) pH 5,39 ± 0,01 (ajustado con solución de hidróxido de sodio 1 N) y metanol (52:48). La elución fue isocrática a un flujo de 1,4 ml/min.

Las soluciones estándar y muestra contenían aproximadamente 0,25 mg/ml, y se empleó ácido clorhídrico 0,01 N como diluyente. Las soluciones fueron sometidas a ultrasonido (10 minutos) y agitadas mecánicamente (10 minutos) durante su preparación. Después se completó a volumen con diluyente, se filtraron aproximadamente 5 ml a través de un filtro de membrana de nylon (tamaño de poro 0,45 µm) y se descartaron los primeros ml del filtrado. Se inyectaron 20 µl de estas soluciones.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

El protocolo de validación⁶⁻¹⁶ incluyó la realización de especificidad, retención en filtros, estabilidad de las soluciones, linealidad, exactitud, precisión y robustez. Se trabajó con una resolución mínima de 1,5, con un factor de asimetría menor o igual a 2 y un número de platos teóricos mayor a 4000.^{11, 12}

ESPECIFICIDAD O SELECTIVIDAD

Para evaluar este parámetro, se emplearon placebos y excipientes presentes en las distintas formulaciones de ambas formas farmacéuticas, que fueron sometidos al mismo tratamiento que la solución muestra. Los excipientes ensayados fueron: aspartamo, dióxido de silicio coloidal, dióxido de titanio, goma xántica, sabor tutti-frutti, sacarina sódica, sorbitol, croscarmelosa, citrato de sodio, lauril sulfato de sodio, povidona (PVP K30), benzoato de sodio, estearil fumarato de sodio, talco y almidón pregelatinizado. También se prepararon soluciones de placebos de cápsulas y suspensiones.

Además, se realizaron degradaciones forzadas sobre el analito: termólisis, hidrólisis alcalina, hidrólisis ácida, fotólisis, oxidación y reducción (ver Figuras 1, 2 y 3).

RETENCIÓN EN FILTROS

Se evaluó el proceso de filtración con dos membranas de 0,45 µm de tamaño de poro con diferentes características estructurales: nylon y celulosa. Para ello, se prepararon soluciones estándar y muestra para cada forma farmacéutica, y se determinó la recuperación luego de filtrar tres fracciones de 4 ml cada una, las cuales se compararon con una fracción centrifugada (recuperación 100 %). La recuperación resultó válida dentro del rango 100,0 ± 1,0 %.

ESTABILIDAD DE LAS SOLUCIONES

Se estudió la estabilidad de las soluciones de trabajo para ambas formas farmacéuticas, conservadas a una temperatura de entre 2°C y 8°C durante 7 días. La estabilidad resultó válida, ya que la recuperación del principio activo se mantuvo dentro del rango 100,0 ± 1,0 % durante el período estudiado.

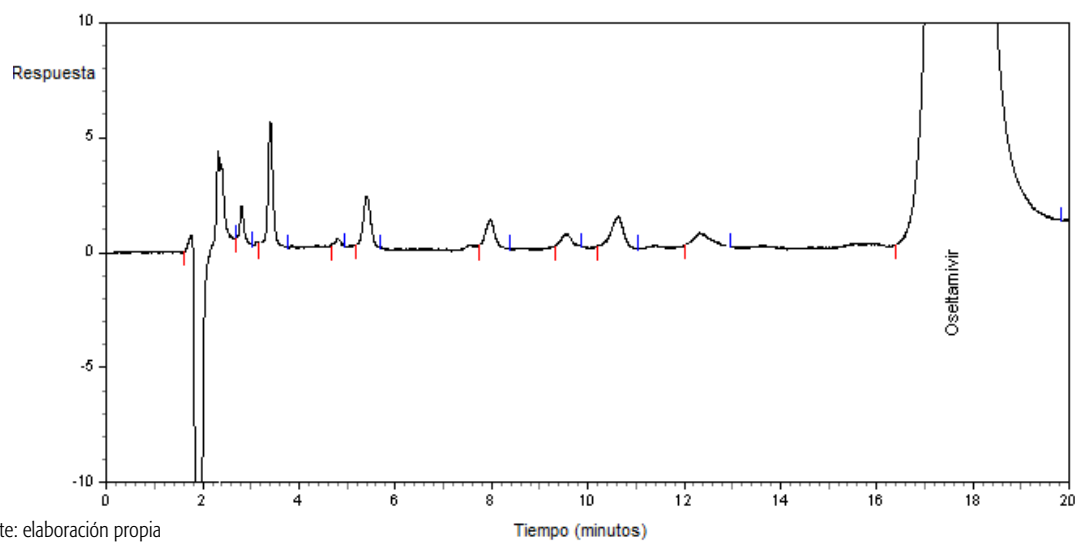
LINEALIDAD Y RANGO

Consistió en el análisis cromatográfico de cinco niveles del principio activo entre 50 y 150 % de la concentración de trabajo propuesta para el método. Los resultados del tratamiento estadístico aplicado se exhiben en la Tabla 1.

EXACTITUD

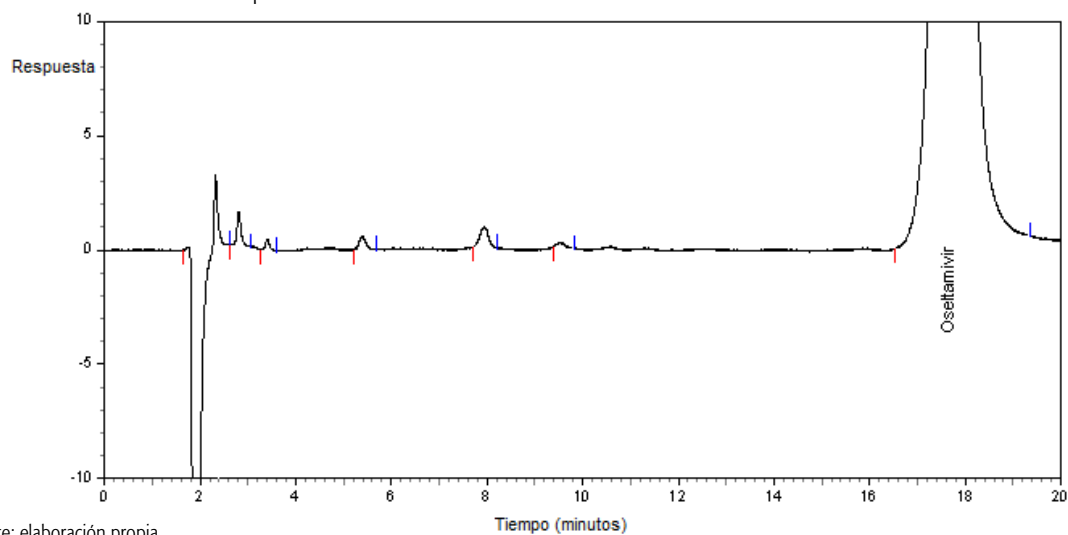
Se realizó el análisis de muestras para ambas formas farmacéuticas a tres niveles de concentración (80, 100 y 120 %), cada uno de ellos por triplicado. La exactitud se verificó mediante el test de Student ($t_{0,05;n-1}$). Los estadísticos de prueba t obtenidos para cápsulas y polvo para suspensión oral fueron 0,750 y 1,848, respectivamente. Dado que ambos valores resultaron ser menores al valor

FIGURA 1. Termólisis. Tratamiento: 80 °C - 20 días

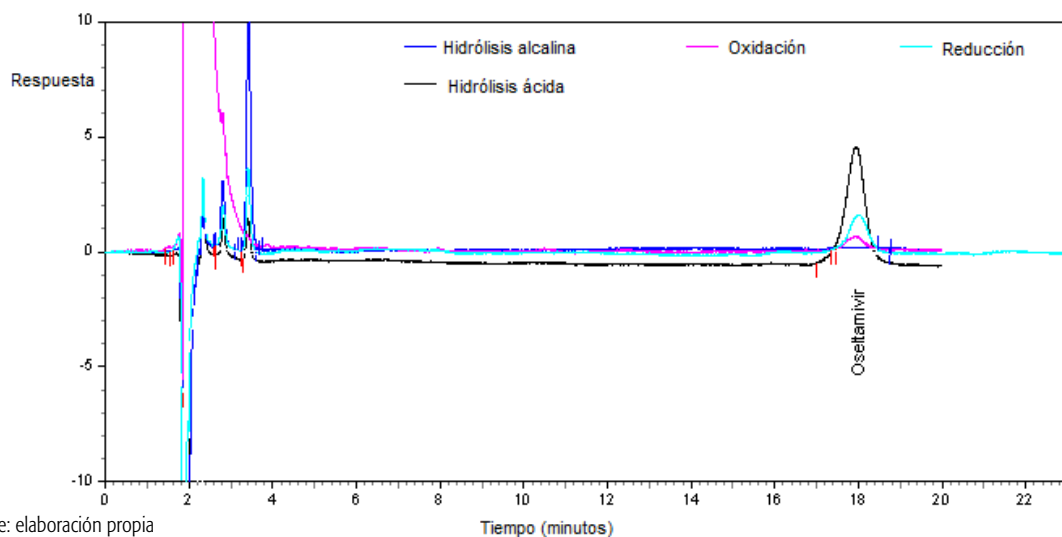


Fuente: elaboración propia

FIGURA 2. Fotólisis. Tratamiento: exposición a luz natural - 20 días



Fuente: elaboración propia

FIGURA 3. Degradaciones forzadas. Tratamientos a 65 °C durante 40 minutos: ácido con HCl 1 N; alcalino con NaOH 1 N; oxidación con H₂O₂ 30 % y reducción con Zn y HCl 1 N.

Fuente: elaboración propia

de tabla (t tabla 2,306), se concluyó que no existe diferencia significativa entre los promedios de recuperación en cada nivel de concentración para ambas formas farmacéuticas.

PRECISIÓN

Se evaluaron los siguientes parámetros: precisión del sistema, repetibilidad y precisión intermedia.

- **PRECISIÓN DEL SISTEMA:** Se realizaron seis inyecciones repetidas de una solución a la concentración de trabajo y se calculó el respectivo coeficiente de variación porcentual (CV%). Se obtuvo un CV% de 0,2 entre las seis repeticiones, con un límite de aceptación de 1,0 %.

- **REPETIBILIDAD:** Se evaluó el desempeño del método propuesto sobre una muestra analizada en las mismas condiciones (mismo analista, mismo día, mismo equipo). Para ello, se realizaron seis preparaciones independientes del 100 % del ensayo de exactitud (placebo + estándar). Con los resultados obtenidos, se calculó la media (100,6 %), la desviación estándar (0,5456) y la desviación estándar relativa (0,5 %), los valores máximo (101,3 %) y mínimo (99,9 %) con su desviación estándar (0,9840) y el intervalo de confianza de la media mediante el test de Student ($t_{0,05;n-1}$) (0,5726). Con los límites superior e inferior del intervalo de confianza de la media definidos en 101,1 y 100,0 %, respectivamente, dos de los valores individuales quedaron fuera del intervalo. Por lo tanto, se comparó la desviación estándar entre los valores máximo y mínimo (0,9840) con el valor de tabla (t tabla 2,5706); dado que dicha desviación estándar resultó ser menor, el ensayo fue considerado satisfactorio.

- **PRECISIÓN INTERMEDIA:** Para evaluar el desempeño del método, se utilizó un estudio de repetibilidad (otro día y otro analista) mediante la realización de tres preparaciones independientes. Las varianzas de las seis muestras de repetibilidad (0,5456)

TABLA 1. Tratamiento estadístico. Linealidad.

Parámetros	Criterio de aceptación	Resultados
Coefficiente de regresión lineal (r2)	> 0,99	> 0,999
Pendiente (b)	S/E*	543553
Ordenada al origen (a)	S/E	2522
Intervalo de confianza de a	Debe incluir al cero	(-2000;7044)
Estadístico Tr	Mayor al de tablas	1132 >>> 2,048
Relación Y ajustado/Y experimental en el nivel del 100%	0,98-1,02	Para las seis determinaciones 1,00
Bondad de ajuste o BIAS	< 2,0%	Cumple
Verificación de la homocedasticidad	No se deben observar tendencias en la gráfica de residuos vs. concentración	Cumple

* S/E: Sin especificación.
Fuente: elaboración propia.

TABLA 2. Robustez.

Condiciones	Muestra 1 (%)	Muestra 2 (%)	Muestra 3 (%)
Originales	99,8	99,9	100,4
Flujo 1,6 (ml/min)	99,2	99,5	99,6
Flujo 1,2 (ml/min)	100,3	100,5	100,6
Composición de la fase móvil Solución reguladora: metanol (45:55)	100,4	100,8	100,5
Columna Phenosphere C8 250 x 4,6 mm (5 µm) 80 A	101,2	102,3	100,5
Promedio (%)	100,2	100,6	100,3
C.V. %*	0,7	1,1	0,4
Promedio total (%)	100,8		
C.V. % total	0,8		

* C.V. %: Coeficiente de variación porcentual.
Fuente: elaboración propia.

y las tres de precisión intermedia (0,6110) fueron comparadas mediante el test de Fisher $F(0,05;2;5)$. El ensayo se consideró válido, ya que el F obtenido (1,2542) < F tabla (5,7861), lo que demostró que no existe una diferencia significativa entre las varianzas.

- **ROBUSTEZ:** Se determinó la recuperación de tres muestras (estándar + placebo) en el nivel del 100 %, bajo distintas condiciones seleccionadas en base al conocimiento adquirido en el desarrollo analítico del método. Los parámetros seleccionados para sus modificaciones y los resultados

obtenidos se resumen en la Tabla 2.

Los resultados de la valoración de las tres muestras independientes, analizadas en las diferentes condiciones, se mantuvieron dentro del 100,0 ± 2,0 %.

DISCUSIÓN

Durante el desarrollo del método se probaron distintas fases móviles, cuyo componente acuoso fue modificado en función de la naturaleza química de la molécula y la capacidad amortiguadora de las diferentes soluciones de sales. Las pruebas con soluciones amortiguadoras de citratos, acetatos y fosfatos demostraron que el pH de

la fase móvil es crítico para la separación del pico principal con el de su impureza más cercana. La separación óptima se logró con la solución reguladora de acetato de sodio 0,2 M – ácido acético 0,2 M pH 5,39 ±0,01; esta variación resultó crítica para la resolución. Asimismo, en base a los resultados de recuperación obtenidos en los estudios correspondientes a la estabilidad de las soluciones y la retención en filtros, se establecieron los volúmenes a filtrar de las soluciones de trabajo y los tiempos en que éstas resultan estables.

Los resultados obtenidos demuestran que el método analítico desarrollado permite determinar de forma fiable y reproducible el contenido de oseltamivir en las formas farmacéuticas mencionadas: cápsulas y polvo para suspensión oral.

RELEVANCIA PARA POLÍTICAS E INTERVENCIONES SANITARIAS

La principal ventaja para la autoridad sanitaria es la posibilidad de aplicar el método analítico desarrollado en los productos que se comercializan en el mercado local y que contienen oseltamivir como principio activo.

Se puede realizar el seguimiento de estabilidad para ambas formas farmacéuticas mencionadas y así verificar

las solicitudes de extensión del período de vida útil, que hasta la fecha han sido presentadas por los laboratorios titulares de las especialidades medicinales.

RELEVANCIA PARA LA FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS EN SALUD

El método desarrollado puede ser incorporado a la Farmacopea Argentina como monografía oficial, a fin de ser utilizado en el ámbito de la industria farmacéutica para controlar la calidad de cápsulas y polvo para suspensión oral que contienen oseltamivir.

RELEVANCIA PARA LA INVESTIGACIÓN EN SALUD

Se puede avanzar en el desarrollo de un ensayo para sustancias conexas, con el fin de identificar y cuantificar posibles productos de degradación del principio activo en ambas formas farmacéuticas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración de los laboratorios titulares de las especialidades medicinales que contienen oseltamivir por haber aportado los excipientes, placebos y estándares de trabajo necesarios para el desarrollo del presente estudio.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES: no hubo conflictos de intereses durante la realización del presente estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹ Euro.who.int. Influenza A (H1N1): WHO announces pandemic alert phase 6, of moderate severity, Copenhagen. [Disponible en:

<http://www.euro.who.int/en/what-we-publish/information-for-the-media/sections/press-releases/2009/06/influenza-a-h1n1-who-announces-pandemic-alert-phase-6,-of-moderate-severity>] [Último acceso: julio de 2009].

² Green MD, Nettey H, Wirtz RA. Determination of Oseltamivir Quality by Colorimetric and Liquid Chromatographic Methods. *Emerging Infectious Diseases*, 2008; 14(4):552-556.

³ Cdc.gov. Updated Interim Recommendations for the Use of Antiviral Medications in the Treatment and Prevention of Influenza for the 2009-2010 Season, Atlanta. [Disponible en: <http://www.cdc.gov/H1N1flu/recommendations.htm#>] [Último acceso: julio de 2009].

⁴ New.paho.org. Recomendaciones sobre el uso de los antivirales, Ginebra. [Disponible en: http://new.paho.org/arg/index.php?option=com_content&task=view&id=349&Itemid=259] [Último acceso: julio de 2009].

⁵ Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), Buenos Aires. [Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/aplicaciones_net/applications/consultas/consultas/consulta_puntual.htm] [Último acceso: diciembre de 2010].

⁶ Ministerio de Salud de la Nación, ANMAT. 1130. Validación de Métodos Analíticos. *Farmacopea Argentina*, vol. 1, 7a ed., p. 403-407. Argentina, 2002.

⁷ Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos de América. <1225> Validación de Procedimientos Farmacopeicos. *USP NF 2009*, vol. 1, 32ª ed., p. 802-806. Estados Unidos de América, 2009.

⁸ International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. *ICH Expert Working Group*. Q2 (R1). ICH, 2005.

⁹ U.S. Food and Drug Administration. Guidance for Industry Analytical Procedures and Methods Validation Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation. Center for Drug Evaluation and Research / Center for Biologicals Evaluation and Research. Estados Unidos de América, 2000. [Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm122858.pdf>] [Último acceso: diciembre de 2010].

¹⁰ U.S. Food and Drug Administration. Validation of Chromatographic Methods. Center for Drug Evaluation and Research. *Reviewer guidance*. Estados Unidos de América, 1994.

¹¹ Ministerio de Salud de la Nación, ANMAT. 100. Cromatografía. Farmacopea Argentina, vol. 1, 7ª ed., p. 59-71. Argentina, 2002.

¹² Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos de América. <621> Cromatografía. *USP NF 2009*, vol. 1, 32ª ed., p.248-260. Estados Unidos de América, 2009.

¹³ Miller JC, Miller JN. Estadística para Química Analítica, 2ª ed., *Addison-Wesley Iberoamericana*. Argentina, 1993.

¹⁴ Organización Mundial de la Salud. WHO Technical Report Series 957. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Forty-fourth report. Ginebra, 2010.

¹⁵ Organización Mundial de la Salud. WHO Technical Report Series 937. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. *Fortieth report: Anexo 4*. Ginebra, 2006.

¹⁶ Association of Official Analytical Chemists. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. *AOAC International*, 2002.