
Evaluaciones de desempeño de los métodos analíticos aplicados en la Pravastatina sódica 40 mg de producción nacional

Autores: Caridad Margarita García Peña^{*1}, Antonio Iraizoz Barrios², Ledys Alejandra Negrín Iser³, María Aurora Barrios Álvarez⁴, Antonio Iraizoz Colarte⁴, Marilyn López Armas⁵

¹Doctora en Ciencias Farmacéuticas. Investigador Auxiliar. Tecnóloga de Primer Nivel. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). correo electrónico: caridad.garcia@cidem.cu

²Master en Tecnología y Control de Medicamentos. Investigador Agregado. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). correo electrónico: antonio.iraizoz@cidem.cu

³Master en Tecnología y Control de Medicamentos. Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL). correo electrónico: caridad.garcia@cidem.cu

⁴Doctor en Ciencias. Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL). correo electrónico: antonio.iraizoz@cidem.cu

⁵Técnico en Tecnología Farmacéutica. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). correo electrónico: marilyn.lopez@cidem.cu

*Autor de correspondencia: DraC. Caridad Margarita García Peña. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Ave 26 No. 1605 e/ Boyeros y Puentes Grandes. Plaza de la Revolución. La Habana. Cuba. e-mail: caridadgp@infomed.sld.cu, caridad.garcia@cidem.cu

RESUMEN

Introducción: La Pravastatina sódica se indica en diferentes patologías, tales como: hipercolesterolemia, cardiopatía y en pacientes con infarto de miocardio previo y niveles normales de colesterol para prevenir el riesgo del infarto. En la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 41, 2018) aparece reportado dos métodos analíticos para la Pravastatina tabletas.

Objetivos: Evaluar el desempeño de los métodos analíticos que se emplean en la cuantificación del ingrediente farmacéutico activo y los ensayos de disolución de las tabletas de Pravastatina 40 mg de producción nacional.

Conclusions: It was demonstrated through experimental tests, the reliability of both methods to offer safe results in quality control and stability studies, for the quantification of the active pharmaceutical ingredient and the dissolution test applicable to Pravastatin 40 mg tablets of national production.

Key Words: Pravastatin Sodium, tablets, Spectrophotometry, High Resolution Liquid Chromatography, Validation.

INTRODUCCIÓN

La Pravastatina sódica es un metabolito fúngico, aislado de cultivos de *Nocardia Autotrophica*. Es un polvo fino, cristalino de color blanco e inodoro. Es soluble en metanol y agua, ligeramente soluble en isopropanol, alcohol y prácticamente insoluble en acetona, cloroformo y éter (1). Su fórmula empírica es: $C_{23}H_{35}NaO_7$, mientras que su nombre químico es (3R,5R)-3,5-dihidroxi-7-[(1S,2S,6S,8S,8aR)-6-hidroxi-2-metil-8-[(2S)-2-metilbutanoil]oxi]-1,2,6,7,8,8a-hexahidronaftalen-1-il] heptanoato de sodio, (Figura 1) (1).

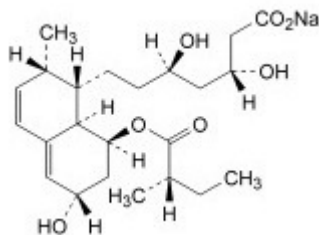


Figura 1. Fórmula estructural de la Pravastatina sódica

Es un agente de la nueva clase de hipolipemiantes que pertenece al grupo de compuestos conocidos como inhibidores de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa la enzima que se encarga de catalizar algunas reacciones en la biosíntesis del colesterol (2).

En la literatura aparecen reportado un método analítico para la cuantificación del ingrediente farmacéutico activo en las tabletas, así como para el ensayo de disolución, empleando la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) y la Espectrofotometría (3).

Los métodos analíticos que se emplean en el control de la calidad y los estudios de estabilidad de medicamentos deben de ser previamente validados para obtener pruebas documentales de la confiabilidad de los mismos para su posterior empleo (4 – 9).

El ensayo de disolución constituye uno de los estudios más importantes en el desarrollo de una forma farmacéutica sólida oral. Permite evaluar los procesos de fabricación, la calidad intra e inter-lotes, además de predecir en algunos casos la bioequivalencia y biodisponibilidad de productos sólidos orales y la estabilidad del preparado farmacéutico (10).

El objetivo de este trabajo fue la evaluación del desempeño de los métodos analíticos aplicables a la cuantificación del ingrediente farmacéutico activo y el ensayo de disolución de las tabletas de Pravastatina sódica 40 mg.

MATERIALES Y MÉTODOS

La sustancia de referencia química de Pravastatina sódica fue suministrada por el grupo de sustancias de referencia del Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM, La Habana, Cuba), el cual fue analizado por el método cromatográfico establecido para realizar el control de la calidad de la materia prima, con una pureza de 99,8 %. El producto terminado en forma de tabletas fue elaborado en el Departamento de Tecnología Farmacéutica del CIDEM, identificado como el lote 001, el cual cumplió con las especificaciones de calidad establecidas para el control de la calidad de las tabletas.

Todos los reactivos utilizados fueron de grado HPLC, procedentes de la Riedel –de Haen.

Método para la cuantificación del Ingrediente Farmacéutico Activo

En el ensayo se empleó un cromatógrafo (KNAUER) con detector UV/VIS (KNAUER) ajustado a 238 nm, un dosificador (*loop*) de 20 μ L e integrador (SHIMADZU CR 8 A). La separación se realizó isocráticamente sobre una columna Lichrospher 100, RP-18 (5 μ m). La fase móvil consistió en una mezcla desgasificada de metanol, agua, ácido acético glacial y trietilamina; con una velocidad de flujo de 1,0 mL/min (3).

Para la cuantificación de la Pravastatina sódica, se disuelve una cantidad exacta de la sustancia de referencia química en una solución de fosfato de potasio a pH 5,0, hasta lograr una concentración final alrededor de 50 μ g/mL.

Las muestras fueron preparadas pesando el equivalente al peso promedio de una tableta de cada formulación disolviéndolas en una solución de fosfato de potasio a pH 5,0, obteniéndose una concentración similar a la sustancia de referencia química.

En el estudio de validación se evaluaron los siguientes parámetros:

Linealidad

Para el estudio de la linealidad de la respuesta del detector se preparó una curva de calibración con solución de la sustancia de referencia química de Pravastatina sódica en un rango de concentraciones que representan el 50 – 150 % de la concentración teórica del IFA en la solución, por triplicado.

Criterios: La ecuación de la recta debe ser igual: $y = mx + b$; el coeficiente de correlación ($r \geq 0,999$); el coeficiente de variación de los factores de respuesta ($CV_f \leq 5,0\%$); en la prueba de significación del intercepto para un 95,0 % de confianza, mediante la t Student, la t calculada (t cal) debe ser menor que la t tabulada (t tab) (4-9).

Especificidad

Con el objetivo de evaluar la especificidad del método se analizaron: la sustancia de referencia química de Pravastatina sódica; el placebo; muestra y muestras sometidas a condiciones drásticas tales como: medio ácido (HCL 3 mol/L), medio básico (NaOH 3 mol/L), oxidación (2 mL de reactivo de H₂O₂). Las muestras sometidas a condiciones drásticas fueron conservadas a temperatura ambiente (30 ± 2 °C, 70 ± 5 % de humedad relativa) durante 7 días, antes de su análisis por cromatografía. Simultáneamente se realizó un barrido al pico correspondiente a la Pravastatina sódica en un rango de 200 a 400 nm con el objetivo de determinar la pureza del pico correspondiente al Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA).

Criterio: No se debe obtener señales del placebo, ni de los productos de degradación en la zona de elusión del ingrediente activo (4-9).

Precisión

Se evaluó la precisión del método a través de los estudios de repetibilidad y precisión intermedia. La repetibilidad se estudió sobre la base de 6 determinaciones, a muestras reales al 100%. Para el estudio de la precisión intermedia se efectuaron valoraciones por dos analistas en dos días diferentes.

Criterio: Repetibilidad ($C.V \leq 2,0$). Precisión intermedia (t calculada debe ser menor t tabulada; F calculada debe ser menor F tabulada) (4-9).

Exactitud

En el estudio de la exactitud y linealidad del método se empleó el método de recuperación, preparando muestras con diferentes niveles de la concentración teórica del IFA en la solución: bajo, medio y alto correspondiente con el 80, 100 y 120 %, respectivamente.

Criterios: La ecuación de la recta debe ser igual: $y = mx + b$; el coeficiente de correlación ($r \geq 0,999$); el coeficiente de variación de los factores de respuesta ($CV_f \leq 5,0 \%$); en la prueba de significación del intercepto, para un 95,0 % de confianza, mediante la prueba de t Student, la t calculada (t cal) debe ser menor que la t tabulada (t tab); la prueba de Cochran (G calculada debe ser menor que G tabulada) (4-9).

Descripción del método para el ensayo de disolución

En el ensayo de disolución se emplearon las siguientes condiciones:(3)

- ❖ Volumen: 900 mL
- ❖ Aparato 2: Paleta
- ❖ Velocidad: 100 rpm
- ❖ Tiempo: 30 minutos
- ❖ Medio de disolución: Agua desionizada

Para el análisis se disolvió una cantidad exacta de la sustancia de referencia química en 100 mL de agua destilada, luego se completó volumen con el medio de disolución utilizado y posteriormente se realizó una dilución en solución de fosfato de potasio a pH 5,0; hasta obtener una solución con una concentración final de 20 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente se realizó la lectura por espectrofotometría a una longitud de onda de 238 nm.

En el caso de las muestras: se añadió una tableta en cada una de las plazas del disolutor bajo las condiciones ya descritas anteriormente.

Para el ensayo de disolución, la validación se realizó a través de los siguientes parámetros:

Linealidad

Para el estudio de la linealidad de la respuesta del detector para las tabletas de Pravastatina sódica, se preparó una curva de calibración con soluciones de la sustancia de referencia química en un rango de concentraciones que representan el 50, 80, 100, 120 y 150 %.

Los criterios de aceptación fueron los mismos que para la validación del método anterior (10-14).

Precisión

Se evaluó la precisión del método empleando muestras de tabletas, evaluándose en dos días diferentes.

Criterios: El valor de t calculada de cada muestra debe ser menor que el valor de t tabulada, para un 95,0 % de confianza (10-14).

Especificidad

El estudio de especificidad se llevó a cabo empleando muestras de tabletas placebos, y muestras de producto terminado, realizándose los ensayos de disolución, en medio agua desionizada, 900 mL, a 100 rpm, paleta, durante 30 minutos. Posteriormente se realizaron las lecturas, por espectrofotometría, a una longitud de onda de 238 nm.

Criterio: El placebo no debe absorber en la zona de máxima absorción de la muestra y de la sustancia de referencia química (10-14).

Influencia del filtrado

Se evaluó la influencia de la filtración con el objetivo de probar la posible interferencia en la respuesta analítica. Se analizaron los resultados comparando las muestras filtradas con papel de filtro y con filtro de línea.

Criterios: Los valores de t calculada para cada una de las muestras debe ser menor que el valor de la t tabulada al compararse estadísticamente los resultados obtenidos de cada uno de los medios filtrantes, para un 95,0 % de confianza (10-14).

RESULTADOS

Evaluación del desempeño del método para la cuantificación del IFA en el producto terminado

Especificidad

La figura 2 muestra los resultados obtenidos en el estudio de especificidad del método.

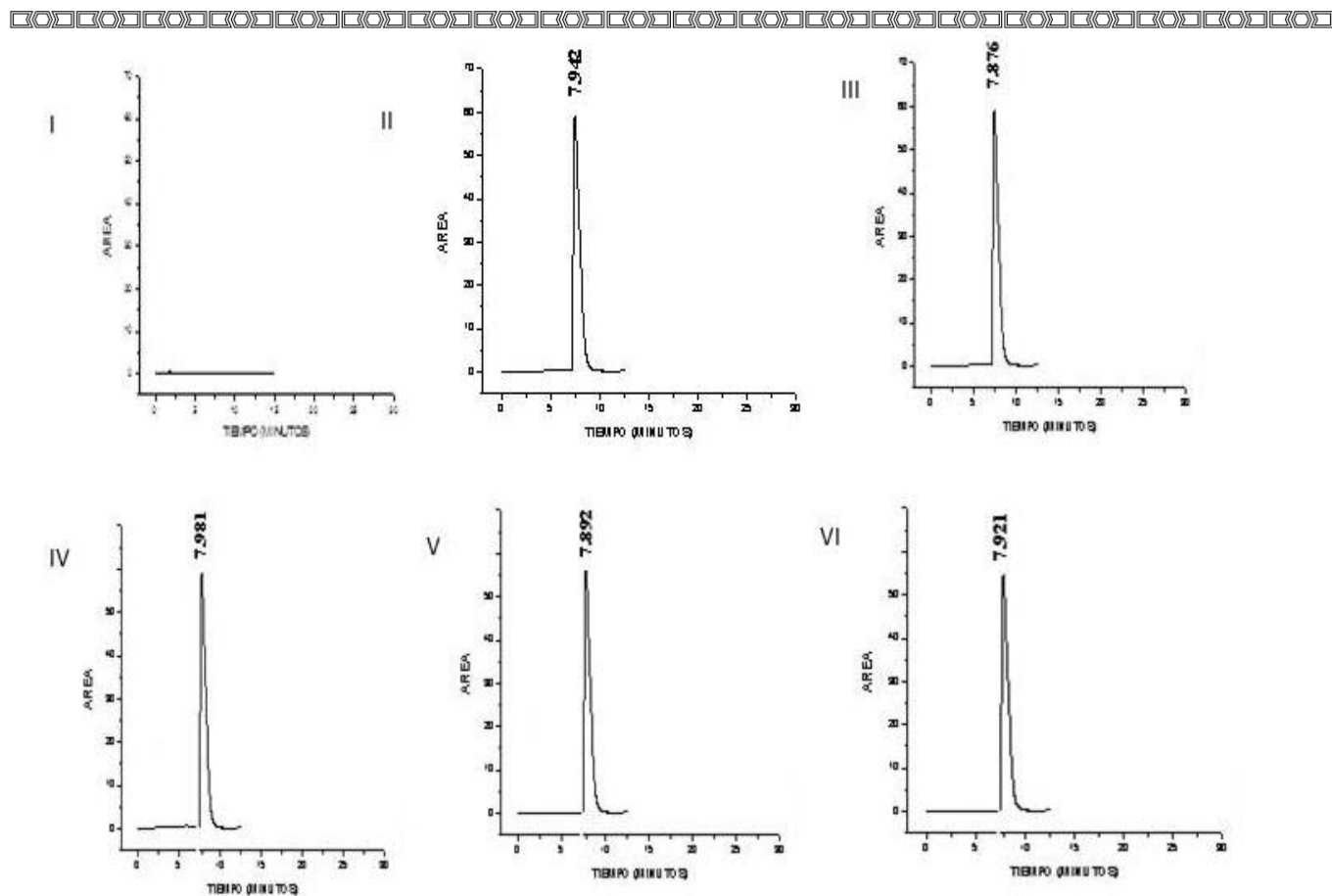


Figura 2: Resultados del estudio de especificidad del método. Cromatogramas: I- placebo. II- solución de referencia química. III- muestra de Pravastatina sódica en la tableta. IV- muestra sometida en medio básico. V- muestra sometida en medio ácido. VI- muestra sometida a oxidación.

Linealidad

La ecuación de la recta de la curva de calibración se obtuvo en el rango de concentraciones entre 25 y 75 µg/mL, se expresó según $y = 0,993 X + 0,542$, con un coeficiente de correlación lineal de 0,999. Al aplicar la prueba de significación del intercepto se obtuvo una $t_{cal} = 1,87$ para una $t_{tab} = 3,18$. Cuando se aplicó la prueba de linealidad mediante los coeficientes de variación de los factores de respuesta CV_f se obtuvo como resultado 3,5 %.

Precisión

Los resultados del estudio de la precisión aparecen en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados de la precisión del método analítico

Analista 1 (%)		Analista 2 (%)	
Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
97,6	97,2	96,2	98,1
96,9	97,6	97,1	97,6
97,6	98,3	97,3	97,1
97,6	97,6	97,6	97,3
97,5	97,6	97,5	97,6
98,1	98,1	98,1	97,3
Media= 97,55 % C.V= 0,39 %	Media= 97,73 % C.V= 0,40 %	Media= 97,30 % C.V= 0,65 %	Media= 97,50 % C.V= 0,36 %
t _{cal} = 0,94 t _{tab} = 2,33		F _{cal} = 1,07 F _{tab} = 5,05	

Leyenda: C.V: coeficiente de variación; cal: calculado; tab: tabulado

Los valores obtenidos para el estudio de la precisión intermedia demostraron que no existieron diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por los analistas en diferentes días para una probabilidad de 0,05 % ya que el valor de $F_{calculada}$ fue menor que la $F_{tabulada}$. Al realizar la prueba de t Student el valor calculado fue 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 5,0 %.

Exactitud

La ecuación de la curva de calibración fue $y = 0,9542 X + 0,3215$ con un valor del coeficiente de correlación de 0,999. Al aplicar la prueba de significación de Cochran, se obtuvo una $G_{cal} = 0,707$ menor a la $G_{tab} = 0,797$, mientras que en la prueba de significación entre la recuperación media y el 100 % de recuperación, se obtuvo una $t_{cal} = 1,74$ para una $t_{tab} = 2,30$. En el rango seleccionado en el estudio de exactitud, el valor de por ciento de recobro fue de 100,01 % y los valores del coeficiente de variación para cada uno de los niveles de concentración estudiados resultaron menores del 2,0 %.

Evaluación del desempeño del método analítico para el ensayo de disolución



Linealidad

La curva de calibración resultó lineal en el rango de concentraciones comprendido, obteniéndose la siguiente ecuación de la recta: $y = 0,2415 X + 0,0124$ con un coeficiente de correlación igual a 0,999. Al aplicar la prueba de linealidad, utilizando el coeficiente de variación de los factores de respuesta, se obtuvo un $CV_f = 1,25 \%$

Precisión

Los resultados en el estudio de la precisión del método se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Resultados de la precisión del método cromatográfico

Muestras	Primer día (%)	Segundo día (%)	t cal
1	99,2	100,2	0,25
2	98,7	99,3	0,41
3	100,1	102,5	1,12
4	98,1	96,2	1,87
5	98,2	98,6	0,12
6	99,1	98,1	0,87
t tab (95%, 5) = 2,57			

Leyenda: cal: calculado; tab: tabulado

Especificidad

En todos los casos las muestras de placebo al ser analizadas, las lecturas fueron inferiores a 0,002, no se observó señal cuantificable de los excipientes de la formulación en la determinación del IFA.

Influencia del filtrado

Los resultados de la influencia de la filtración aparecen reflejados en la tabla 3, como las medias de los ensayos empleando muestras filtradas con papel y filtro de línea.

Tabla 3. Resultados de la influencia del filtrado

Muestras	Muestras filtradas por papel (%)	Muestras filtradas por filtro de línea (%)	t cal
1	99,2	99,7	0,52
2	98,7	96,3	1,23
3	100,1	99,4	0,87
4	98,1	99,9	1,65
5	98,2	97,1	1,02
6	99,1	100,6	1,54
t tab (95%, 5) = 2,57			

Leyenda: cal: calculado; tab: tabulado

DISCUSIÓN

Evaluación del desempeño del método para la cuantificación del IFA en el producto terminado

Especificidad

Como se observó en el cromatograma correspondiente al placebo (I) no se obtiene señal en la zona de interés, al ser comparado con la sustancia de referencia química (II) y la muestra de Pravastatina sódica tabletas (III), lo cual indicó que los excipientes no interfieren en la determinación del ingrediente activo. En cuanto a las muestras sometidas a condiciones drásticas no se observaron en los cromatogramas (IV, V, VI) interferencias en la determinación del IFA, por la aparición de picos secundarios, y si se observó una ligera disminución del área y altura en los cromatogramas correspondientes a las muestras sometidas a condiciones extremas (4-9).

Simultáneamente se realizó un barrido al pico correspondiente al ingrediente activo en un rango de 200 a 400 nm, obteniéndose una pureza del 99,6 %, demostrándose el no solapamiento de los productos de degradación en la señal del IFA.

Los resultados de este estudio demostraron la especificidad del método porque no se observa interferencia de los excipientes y productos de degradación en la determinación del ingrediente activo, en las condiciones ensayadas.

Linealidad

El valor del coeficiente de correlación y determinación fueron superiores a los exigidos: 0,990 y 0,980, respectivamente, demostrándose con los valores obtenidos cercanos a la unidad, el grado de relación entre las variables de concentración y respuesta detectadas por el equipo empleado. El coeficiente de variación de los factores de respuesta y la desviación estándar relativa de la pendiente fue inferior a lo establecido para estos indicadores: 5,0 y 2,0 %, respectivamente. Ambos son considerados estimadores puntuales que permiten caracterizar la variabilidad. El coeficiente de variación de los factores de respuesta evalúa la variabilidad en la relación respuesta y concentración, para cada nivel evaluado (4-9).

Precisión

Los resultados obtenidos demostraron la buena precisión de los métodos según los límites para los métodos cromatográficos: $CV \leq 2,0 \%$. Los valores obtenidos en las pruebas de Fischer y t-Student, 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 calculado fue menor que la F tabulada. Al realizar la prueba de t-Student, el valor calculado resultó menor que el tabulado para un 95 % de confianza, lo que demuestra que no existen diferencias significativas entre las medias alcanzadas y por tanto la buena precisión del método (4-9).

Exactitud

Los valores de recobrado y coeficiente de variación total se encontraron dentro de los límites establecidos (98,0 a 102,0 % y $\leq 2,0 \%$), respectivamente. Al aplicar la prueba de Cochran se obtuvo G calculada menor que la tabulada, para 95 % de confianza, por lo tanto, las varianzas de las concentraciones estudiadas fueron equivalentes indicando que la concentración no influyó en la variabilidad de estos resultados (4-9).

El método analítico por CLAR aplicable al control de la calidad y estudio de estabilidad de las tabletas de Pravastatina sódica 40 mg, resultó específico, preciso, lineal, preciso y exacto en el rango de concentraciones de 80 a 120 %.

Evaluación del desempeño del método analítico para el ensayo de disolución

Linealidad

Los resultados obtenidos demuestran la linealidad del método, ya que los valores de los coeficientes de regresión y de determinación resultaron superiores a los exigidos (0,990 y 0,980). Además, el

coeficiente de variación del factor de respuesta y desviación estándar relativa de la pendiente fueron inferiores al normalizado como máximo para estos indicadores: 5,0 y 2,0 %, respectivamente (10-14).

Precisión

Los resultados de las medias permitieron concluir que el método fue preciso ya que en todos los casos los valores de t calculada resultaron inferiores al valor de t tabulada, demostrándose que no existieron diferencias significativas entre las medias para cada tableta (10-14).

Especificidad

Los resultados de la especificidad permitieron afirmar que el método fue específico con relación a los excipientes que componen la tableta, debido a que no se observaron señales cuantificables al analizar las muestras placebo. Sin embargo, se observó presentando la muestra y el analito una absorbancia semejante.

Influencia del filtrado

No existieron diferencias significativas, ya que en todo momento la t cal resultó menor que la t tab para cada muestra, se pudo afirmar que la filtración por papel no adsorbió el IFA ni aportó interferencias al filtrado, siendo posible su empleo. Además posibilitó contar con un medio de filtración alternativo para el ensayo de disolución de las tabletas de Pravastatina sódica de producción nacional.

Se demostró elevado desempeño de las condiciones del ensayo de disolución, para las tabletas de Pravastatina sódica de 40 mg de producción nacional, con resultados ajustados a la linealidad del 50 al 150 %, precisión y especificidad.

LITERATURA CITADA

1. Vademecum.es [Internet]. España; 2011. [Fecha de acceso: Junio del 2013]. Disponible en: <http://www.vademecum.es/principios-activos- pravastatina-c10aa03>.
2. MurciaSalud.es [Internet]. España; 2010. [Fecha de acceso: Junio del 2013]. Disponible en: www.murciasalud.es/gftb.php?idsec=474&opt=todos&area=1.
3. Farmacopea de USP 41 - United State Pharmacopeia (2018). US Pharmacopeia Convention, Inc. Washington DC. 359-362, 3218, 7340, 7685, 7688, 7691.
4. Zheng J. Formulation and Analytical Development for Low-Dose Oral Drug Products. USA: NJ. John Wiley & Sons, Inc; 2009.

-
5. Anexo I CECMED (2013). Buenas Prácticas para Laboratorio de Control de Medicamentos. Validación de Métodos Analíticos. Centro Estatal para el Control de Medicamentos (CECMED). 2013. Cuba. 3-25.
6. Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation Chemistry, Manufacturing and Controls Documentation. FDA. Centre for Drug Evaluation and Research. 2001.
7. Bliesner DN. Validating Chromatographic Methods: A Practical Guide. USA: NJ, John Wiley & Sons, Inc; 2006.
8. Wegscheider J, et al. Validation of analytical methods, in "Accreditation and quality assurance in analytical chemistry". 1996.
9. Chan CC, Lam H, Lee YC, Zhang X. Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification. Hoboken, NJ; John Wiley & Sons, Inc; 2004.
10. Cox DC, et al. Guidelines for Dissolution Testing. Journal Technology. 2001; 2:41-5c.
11. Fortunado D, et al. Dissolution Technologies: Dissolution Method Development for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms, 2005; 12-14.
12. Development and Validation of Dissolution Tests for Fexofenadine Hydrochloride Capsules and Coated Tablets. Journal Pharmacy Pharmaceutical Science, 2005; 8(2):289-298.
13. Hokanson GC. A life cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development, part 2. Changes and the need for additional validation. Pharmaceutical Technology, 1994; 92-100.
14. Skoug JW, et al. Estrategia para el desarrollo y validación de pruebas de disolución para formas sólidas orales. Pharmaceutical Technology. 1996; 8-15.