

El método de análisis para los estudios de estabilidad y de biodisponibilidad de medicamentos. Parte I

LUZ STELLA OSPINA DE NIGRINIS*

RESUMEN

En este artículo sobre el método de análisis para los estudios de estabilidad y biodisponibilidad de medicamentos, se hace énfasis en el diseño, el desarrollo y la validación de la metodología analítica para el seguimiento de la calidad de los medicamentos. La estabilidad y la biodisponibilidad son indispensables para garantizar la seguridad y la eficacia de estos productos.

La especificidad, la cantidad mínima detectable, la cantidad mínima cuantificable y la sensibilidad del método son los atributos tratados en este artículo. La precisión, la exactitud, la linealidad y la robustez del método son atributos que se tratarán en próximas publicaciones.

SUMMARY

In this paper, dealing with the analytical methods for stability and bioavailability of drugs, will be emphasized the design, development and validation of analytical methodology, with the purpose to monitor the drug quality. Stability and bioavailability are necessary for quality and safety assurance of these products.

In this paper will be discussed specificity, limit of detection, limit of quantitation and sensitivity. Precision, accuracy, linearity and ruggedness will be analyzed in next publications.

I. INTRODUCCION

La acción farmacológica de un medicamento, referida a los aspectos farmacodinámicos, farmacocinéticos y a los potenciales efectos toxicocinéticos, no sólo es función de las propiedades fisicoquímicas y de la configuración espacial de la

molécula del fármaco, sino que está estrechamente relacionada con las características de la forma farmacéutica que vehiculiza el fármaco, tanto de las formas farmacéuticas tradicionales, como de las innovadoras; las del futuro, como resultado del avance de la ingeniería genética y de la biotecnología. Es indudable que se está a las puertas de una generación de medicamentos, esperanza para tratar las tantas enfermedades que han costado muchas vidas.

La eficacia y la seguridad de los medicamentos son cualidades sin las cuales carecen de utilidad y por el contrario, le ocasionan graves problemas al paciente. Cuando el medicamento es **estable y biodisponible** es eficaz y seguro.

La estabilidad de los medicamentos ha sido una preocupación permanente de quienes los diseñan, los desarrollan y los producen, como también de las instancias gubernamentales reguladoras de la calidad de los medicamentos.

El gran desarrollo de los estudios de estabilidad de los productos farmacéuticos, entre los cuales están los medicamentos, es preponderante a partir de 1960. El avance científico y tecnológico en las áreas de la ingeniería electrónica y de la sistematización permitió disponer de la instrumentación suficientemente sensible para el desarrollo de la metodología analítica indispensable, para el seguimiento de los procesos de degradación de los fármacos o de los auxiliares de formulación que constituyen los medicamentos; lo que se evaluaba subjetivamente a través de cambios físicos, ahora puede detectarse, identificarse y cuantificarse con especificidad, exactitud y precisión.

El seguimiento de la estabilidad durante todo el tiempo de la vida útil del medicamento requiere de métodos de análisis específicos, sensibles, exactos, precisos y robustos (1, 2, 3, 4).

Como resultado del trabajo de expertos en áreas especializadas relacionadas con la estabilidad de los fármacos y de los medicamentos, varios países han propuesto guías para abordar estos estudios y en todas ellas se hace especial énfasis en las características del método de análisis para un estudio de estabilidad (1, 5, 6, 7).

* Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia. Apartado Aéreo 14-490. Santafé de Bogotá.

Para que un medicamento sea eficaz, su diseño, desarrollo y formulación deben permitir que sea **biodisponible**, es decir, que una vez que es administrado al paciente, el fármaco quede a disposición del organismo, a nivel del receptor o del sitio de acción. Como puede colegirse es absolutamente indispensable que un medicamento sea biodisponible para que ocurra la acción farmacológica. Todos los medicamentos que recibe un paciente deben ser **biodisponibles** y además, los medicamentos a base de un mismo fármaco y a las mismas dosis deberían ser **bioequivalentes**. Este aspecto es de suma importancia y de mucha actualidad; solamente cuando se garantiza la bioequivalencia, particularmente para aquellos fármacos con un estrecha ventana terapéutica (anticonvulsivos, antibióticos, otros), se puede cambiar un medicamento de una determinada marca por otro, sin riesgos para el paciente (8, 9, 10).

Para desarrollar estudios de biodisponibilidad o de bioequivalencia de medicamentos se requiere de métodos de análisis específicos, sensibles, exactos, precisos y robustos (2, 3, 10). Es un factor crítico en estos estudios, porque a partir de la información obtenida a través del método de análisis se calculan los parámetros biofarmacéuticos y farmacocinéticos (8).

Se debe tener un conocimiento claro y amplio no sólo respecto del método de análisis, sino también del diseño experimental, del análisis estadístico y de la biotransformación de los fármacos, para determinar si la molécula a estudiar es la del fármaco o la del metabolito, el tiempo de muestreo y la muestra biológica más apropiada para el estudio.

II. CARACTERÍSTICAS DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

1. Generalidades

El poder determinar, identificar y cuantificar uno o todos los componentes de la muestra en estudio (fármaco, productos de degradación, metabolitos) mediante un método de análisis adecuado, es fundamental para lograr el objetivo de un estudio de estabilidad o de biodisponibilidad. En los estudios de estabilidad, los productos de degradación aislados e identificados deben ser evaluados farmacológica y toxicológicamente; esta información es valiosísima para determinar los límites de degradación permitidos para el fármaco. Concomitantemente el identificar y cuantificar los productos de degradación, permite reformular el diseño del medicamento y establecer las condiciones de mantenimiento para asegurar su calidad.

Para un estudio de biodisponibilidad, el método de análisis debe ser lo suficientemente específico y sensible, tanto para el estudio de la disolución de los medicamentos, lo cual da una primera información sobre las características de la absorción, como para los estudios in vivo.

En el estudio de la disolución, el método debe permitir diferenciar entre el fármaco y los demás componentes de la formulación, y en el estudio in vivo, el método permitirá diferenciar entre el fármaco, los metabolitos y los componentes endógenos de la muestra. Desde luego el método deberá detectar los niveles mínimos de concentración tanto en el caso de la disolución del fármaco a partir del medicamento, como en el estudio de biodisponibilidad.

Los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* son comparados con el objeto de estudiar, si hay o no correlación entre la velocidad de disolución y los niveles plasmáticos. A partir de las concentraciones plasmáticas, obtenidas de muestras de voluntarios sanos, se calculan los parámetros farmacocinéticos del fármaco o del metabolito activo y también, a partir de las concentraciones plasmáticas se pueden ajustar los regímenes posológicos para alcanzar los niveles plasmáticos adecuados en un paciente determinado (11).

2. Diseño y Evaluación del Método de Análisis

Para diseñar o modificar un método de análisis, para un estudio de estabilidad o de biodisponibilidad, es indispensable conocer ampliamente el comportamiento de la molécula del fármaco, del producto de degradación y del metabolito, basándose en su estructura carbonada, en sus grupos funcionales, en su configuración espacial y en sus propiedades químicas, físicas y biológicas.

Con esta información, en el caso de un estudio de estabilidad, se pueden predecir las posibles rutas de degradación del fármaco como tal, o en presencia de los auxiliares de formulación propios de la forma farmacéutica (12).

De acuerdo a las propiedades químicas, físicas y biológicas del fármaco y a sus probables productos de degradación o de biotransformación se procede a diseñar el método para el fármaco intacto, para los productos de degradación, para los metabolitos o para el fármaco y los productos de degradación o para el fármaco y los metabolitos simultáneamente.

Además, del diseño del método de análisis, para un estudio de biodisponibilidad, es fundamental conocer la ruta metabólica del fármaco, no solamente para predecir los posibles metabolitos, sino para seleccionar la muestra biológica adecuada para la detección y para la cuantificación del fármaco y/o sus metabolitos.

Dentro de la gran variedad de métodos de análisis conocidos para compuestos químicos estructuralmente definidos, los métodos instrumentales son los más ampliamente empleados para estudios de estabilidad y de biodisponibilidad de medicamentos (3, 13).

3. Validación de los Atributos del Método

La necesidad de estar cada vez más cerca del método de análisis óptimo, con el objeto de hacer un seguimiento de la calidad del medicamento como indicador de su eficacia y su seguridad, exige que continuamente se esté investigando, actualizando y revalidando la metodología analítica. Se deberá disponer de la evidencia experimental y documentada sobre la consistencia y la funcionalidad del método para las aplicaciones propuestas, lo cual exige un diseño experimental apropiado y un tratamiento estadístico de los resultados (10, 14, 15, 16).

El método debe ser validado respecto a la especificidad, la cantidad mínima detectable, la cantidad mínima cuantificable, la sensibilidad, la precisión, la linealidad, la exactitud y la robustez (2, 3, 4, 17). El método validado para un medicamento, un fármaco, un producto de degradación o de biotransformación en una muestra determinada no garantiza que pueda ser utilizado indiscriminadamente para cualquier clase de muestra.

3.1 Especificidad o Selectividad

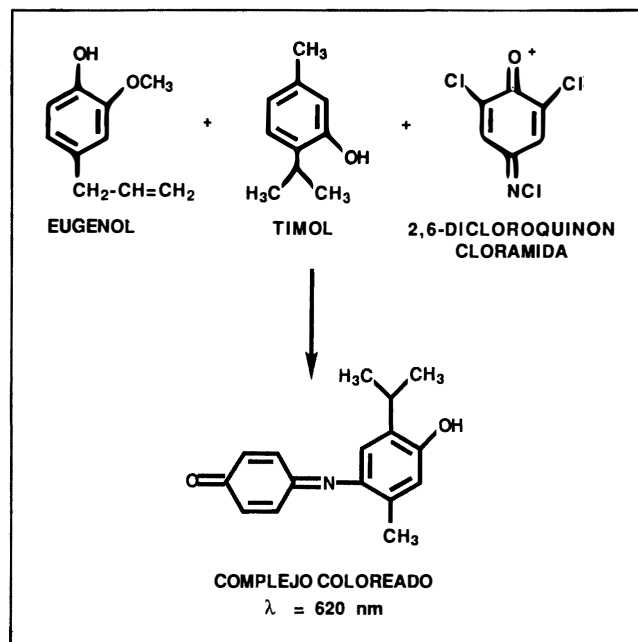
La especificidad del método de análisis es un atributo o propiedad, por la cual la respuesta obtenida corresponde exclusivamente al compuesto que se desea detectar y cuantificar, sin ninguna interferencia por parte de los demás componentes de la muestra.

La composición de la muestra utilizada para un estudio de estabilidad o de biodisponibilidad, generalmente es compleja y puede estar constituida por varios principios activos con los posibles contaminantes como los residuales de la síntesis, los productos de degradación, los productos de biotransformación, los auxiliares de formulación o los componentes endógenos de la muestra biológica.

Hay quienes diferencian entre *especificidad* y *selectividad*; la selectividad hace referencia a la situación en la cual la muestra es compleja y el método tiene la propiedad de dar una respuesta claramente diferenciada para cada uno de los componentes de la muestra (18). Un ejemplo de un método selectivo, es el caso de un método cromatográfico eficiente, porque éste es capaz de separar cada uno de los componentes de la muestra dando una señal característica para cada uno de los compuestos (tiempo de retención t_r o relación de frentes R_f).

La especificidad puede ejemplificarse con el análisis de una muestra constituida por dos fenoles, timol y eugenol. Si la muestra se hace reaccionar con 2,6 dicloroquinon clorimida a pH básico, se produce una reacción entre el fenol no sustituido en posición para (timol) y la 2,6 dicloroquinon

clorimida. El producto de la reacción es un complejo de color azul y su intensidad puede cuantificarse a 620 nm. Este es un ejemplo de una reacción específica porque solamente el fenol no sustituido en posición para produce la reacción.



En los aspectos relacionados con la validación de métodos de análisis, se habla de especificidad más que de selectividad.

Los métodos de análisis descritos en las farmacopeas, generalmente se fundamentan en las propiedades o en la reactividad de los grupos funcionales de las moléculas. Si estos grupos funcionales se conservan en los productos de degradación o de biotransformación, los métodos no serán específicos para un estudio de estabilidad o de biodisponibilidad.

La evaluación de la especificidad de un método de análisis para un estudio de estabilidad o de biodisponibilidad, se hace adicionando a la muestra (medicamento, fármaco o muestra biológica) cantidades conocidas de los productos de degradación o de biotransformación.

La especificidad del método de análisis para los estudios de estabilidad o de biodisponibilidad es una condición sin la cual no se justifica la validación de los demás atributos del método.

3.2 Cantidad mínima detectable o Límite de detección.

La cantidad mínima detectable de un compuesto, por un método de análisis, hace referencia a la concentración más

baja del compuesto en estudio, que es posible detectar con certeza, es decir, que se puede diferenciar de la respuesta dada por el blanco (ruido del blanco), cuando se desarrolla el procedimiento analítico completo con el blanco; por debajo de esta concentración es imposible la detección. El blanco está formado por todos los componentes de la muestra, menos el compuesto objeto de estudio. En la literatura hay una marcada tendencia a confundir los conceptos sobre cantidad mínima detectable y sensibilidad, es decir, que varios investigadores consideran como sinónimos estos dos atributos del método (15, 17, 18, 20). En algunos casos, la cantidad mínima detectable es determinada intuitivamente y esto compromete la validez del método, en otros casos puede estar bien definido el estudio para determinar este parámetro, pero si la metodología estadística no es la apropiada, el método puede ser deficiente.

La probabilidad de aceptar una respuesta como correspondiente a un valor de concentración mínima detectable, cuando esto no es así, (error β) es igual a la probabilidad de rechazar la respuesta considerando que no corresponde a la cantidad mínima detectable cuando si lo es (error α). En esta situación particular, los dos errores tienen la misma probabilidad de ocurrir (14, 16).

La definición de cantidad mínima detectable se basa en métodos estadísticos; el límite de detección es generalmente determinado en función de la media (\bar{y}) de la respuesta dada por el blanco (ruido) cuando se le aplica el método completo y por la desviación estándar (s) o variabilidad del método cuando se le aplica al blanco. La mayoría de los investigadores, que se ocupan de la definición y del estudio de la cantidad mínima detectable, están de acuerdo en que este valor se logra con gran precisión cuando la respuesta producida por esa concentración corresponde al valor medio de la respuesta del blanco (\bar{y}), si ésta presenta una distribución normal, más tres desviaciones estándar (s); es decir: $\bar{y} + 3s$. Por debajo de este valor de respuesta no se puede diferenciar entre la respuesta del blanco y la respuesta dada por la cantidad mínima del compuesto (19, 20, 21, 22).

También se acepta como cantidad mínima detectable, a la concentración del compuesto cuya respuesta, después de aplicar el método completo, es igual a tres veces la señal del ruido o respuesta producida por el blanco, cuando se aplica el método completo al blanco, es decir que la respuesta de la cantidad mínima detectable es igual a $3\bar{y}$ (23).

Dependiendo de la naturaleza y de las características del producto en estudio, por ejemplo la determinación de trazas, la detección de productos de degradación de naturaleza tóxica, o la detección de metabolitos biológicamente activos, el investigador o la instancia reguladora correspondiente fijará el

criterio para calcular la cantidad mínima detectable, para el método que se está proponiendo.

3.3 Cantidad mínima cuantificable o Limite de cuantificación

La cantidad mínima cuantificable, o límite de cuantificación de un compuesto ha sido definida como la concentración más baja de un compuesto que puede ser cuantificado, con un grado de confianza previamente establecido. Como en el caso de la cantidad mínima detectable, estos valores de concentración se calculan a partir del valor de la media (\bar{y}) de varias réplicas del blanco (por lo menos 6) desarrollando en cada caso el método completo, y su desviación estándar (s). Se ha establecido que la cantidad mínima cuantificable es igual a la concentración del compuesto cuya respuesta, cuando se aplica el método completo, corresponde al valor de la media (\bar{y}) + 10 desviaciones estándar (s): $\bar{y} + 10s$ (19, 20, 23, 24). La respuesta dada por este valor de concentración debe cumplir con los criterios de exactitud y de precisión.

Algunos investigadores proponen como cantidad mínima cuantificable la concentración del compuesto cuya respuesta corresponda a diez veces el valor de la media del valor del blanco o ruido del blanco, es decir igual a $10\bar{y}$ (23).

Es importante señalar, que de acuerdo al método instrumental se definen estos valores, por ejemplo, en el caso de la espectrofotometría de absorción se acepta que concentraciones cuya respuesta en función de absorbancia den valores por debajo de 0,1, presentan desviaciones a la ley de Lambert-Beer. Es decir, que en estos métodos la cantidad mínima cuantificable está definida por la concentración cuya respuesta está próxima a un valor de absorbancia de 0,1.

En los procesos de validación, muy pocas veces se hace referencia a la cantidad máxima cuantificable y este valor también es muy importante en la definición del método, pues por encima de este valor de concentración pueden presentarse desviaciones negativas o positivas a la respuesta. En el caso de los métodos espectrofotométricos de absorción al ultravioleta, al visible y al infrarrojo, la cantidad máxima cuantificable debe presentar un valor de absorbancia cercano a 0,85.

Se acostumbra también a calcular la cantidad mínima cuantificable a partir de la ecuación de la recta para el método, ajustada por mínimos cuadrados, con la cual se calcula la respuesta para una concentración 0 y la desviación estándar de la respuesta a la concentración 0. Se hace un análisis de regresión, se calcula nuevamente la ecuación de la recta y a partir de esta expresión, se determina la cantidad mínima cuantificable (17).

Las cantidades mínimas y máximas cuantificables están estrechamente relacionadas con lo que en la literatura se denomina rango lineal o límites de concentración, dentro de los cuales el método presenta regresión lineal y con la sensibilidad del método.

En todo método de análisis, particularmente en los métodos diseñados para los estudios de estabilidad y de biodisponibilidad, es fundamental establecer la cantidad mínima detectable y la cantidad mínima cuantificable. Es necesario utilizar metodologías fundamentadas en consideraciones estadísticas, para que los resultados tengan la validez necesaria, que permita con certeza afirmar o negar la presencia de concentraciones mínimas de un producto de degradación del fármaco, de niveles mínimos de absorción de un fármaco o de sus productos de biotransformación. De un resultado como los señalados, depende la aceptación o modificación del diseño, del desarrollo y de las condiciones de conservación del fármaco o del medicamento para asegurar su estabilidad y su biodisponibilidad.

3.4 Sensibilidad del método

La sensibilidad de un método de análisis es una característica independiente de la concentración y muchas veces ha sido considerada como sinónimo de "cantidad mínima detectable" (16, 17, 18, 25). La sensibilidad es la particularidad del método de presentar un gran cambio en la respuesta cuando hay un pequeño cambio en la concentración. Este valor será constante entre los límites de concentración dentro de los cuales el método presenta regresión lineal. La sensibilidad del método está dada por la pendiente de la curva de calibración y corresponde al cociente entre la diferencia de dos valores de la variable dependiente o respuesta instrumental y la diferencia de los respectivos valores de concentración o variable independiente.

$$\text{Sensibilidad} = \text{pendiente} = (y_2 - y_1) / (x_2 - x_1)$$

$y_2 ; y_1$; valores de variable dependiente

$x_2 ; x_1$; valores de variable independiente

Las unidades corresponden a las respectivas unidades de las dos variables. Es claro entonces que la sensibilidad no es sinónimo de cantidad mínima detectable.

Evidentemente, dos métodos pueden presentar el mismo valor de cantidad mínima detectable pero tener diferente sensibilidad. Por ejemplo, si un compuesto puede ser cuantificado colorimétricamente por el método A y por el método B y la cantidad mínima detectable (x_1) es la misma para los dos métodos, pero el valor de la respuesta es mayor para el método B (y_2) que para el método A (y_1), la sensibilidad del método B

es mayor que la del método A, dentro de los mismo valores de concentración.

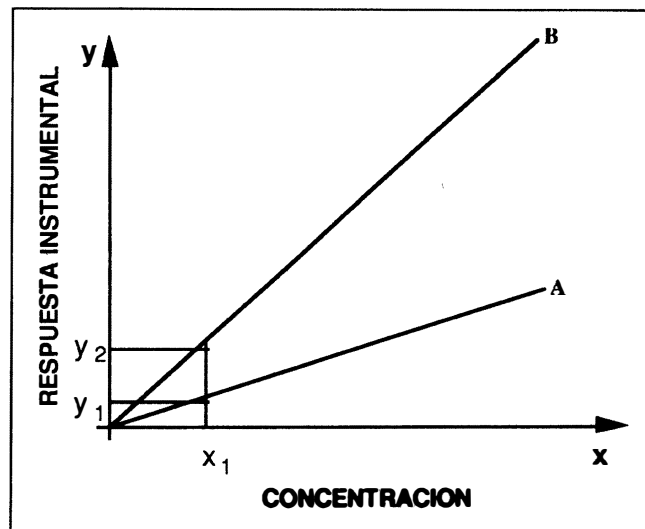


FIGURA N° 1. Comparación de la sensibilidad de dos métodos, A y B, para un valor de concentración x_1

De acuerdo a la estructura molecular del compuesto en estudio, especialmente de los grupos funcionales, es posible obtener derivados a partir de una concentración dada del compuesto y de una concentración de un reactivo apropiado. Los derivados en general incrementan la sensibilidad de la respuesta.

BIBLIOGRAFIA

1. GRIM, W. *Stability testing of drug products*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1987.
2. *Validation of compendial methods (1225): 1982 - 1984*. The United States Pharmacopoeia XXIII. Ed. Pharmacopoeia Convection Inc. Washington, D.C. 1994.
3. OSPINA DE NIGRINIS, L.S. *Rev. Colomb. Cien. Quím. Far.* 20, 50 (1993)
4. TAYLOR, J.K. *Anal. Chem.* 55, 600A (1983)
5. *Guideline for submitting documentation for the stability of human drugs and biologics*. Center for Drugs and Biologics Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services, Rockville, Maryland 20857, february 1987.

6. NAGAI, T. *Japanese guideline for stability testing*. Department of Pharmaceutics, Hoshi University, Tokio, 1984.
7. *Stability considerations in dispensing practice (1191): 1957 - 1959, The stability testing of new drug substances and products - The tripartite guideline (1196): 1959 - 1963*, The United States Pharmacopoeia XXIII, Ed. Pharmacopoeia Convection Inc. Whashington, D.C. 1994.
8. CÁRCAMO, E.C. *Control de calidad biofarmacéutico de medicamentos*. Ed. Balgraf Ltda., Sazié, Santiago de Chile, 1992.
9. *Guidelines and standards for bioavailability of oral dosage formulations of drugs used for systemic effects*. Report B. Expert Advisory Committee on Bioavailability. Health Protection Branch. August, 1990.
10. *In vivo bioequivalence guidances (1090): 1929 - 1937*. The United States Pharmacopoeia XXIII, Ed. Pharmacopoeia Convection Inc. Whashington, D.C. 1994.
11. USOA, E., DU SOUICH, P., ERILL, S., NARANJO, C., OGLVIE, R. *Métodos en farmacología clínica*. Organización Panamericana de la Salud, Washington, D.C. 1991.
12. CONNORS, K.A., AMIDON, G.L., VALENTINO, J. *Chemical stability of pharmaceuticals*. Editorial John Willey and Sons, New York, 1986.
13. SKOOG, D.A., LEARY, J.J. *Análisis Instrumental*. McGraw - Hill, Madrid, 1993.
14. MASSART, D.L., DIJKSTRA, A., KAUFIMAN, L. *Evaluation and optimization of laboratory methods and analytical procedures. A survey of statistical and mathematical techniques*. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Holanda, 1978.
15. BOX, G.E.P., HUNTER, W.G., HUNTER, J.S. *Estadística para investigadores. Introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos*. Editorial Reverté, S.A., Barcelona, 1983.
16. MILLER, J.C., MILLER, J.N., *Estadística para química analítica*. 2da Edición, Addison - Wesley Iberoamericana, S.A., Wilmington, 1993.
17. QUATTROCCHI, O.A., ABELAIRA DE ANDRIZZI, S.I., LALA, R.F. *Introducción a la HPLC. Aplicación práctica*. Artes Gráficas Farro, S.A., Buenos Aires, (1992)
18. NONZIOLI, A.C. *Safiby*, **18**, 1281 (1978)
19. CONACHER, H.B.S., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **73**, 332, (1990).
20. *Nomenclature, symbols, unit and their usage in spectrometrical analysis - II Data interpretation*. International Union of Pure and Applied Chemistry. *Pure and Appl. Chem.* **45**, 90 (1976)
21. BOOKSH, K. S., KOWALSKI, B. R., *Anal Chem.* **66**, 782A (1.994).
22. LONG, G. L., WINEFORDNER, J. D., *Anal Chem.* **55**, 712A (1.983).
23. PARKER, G.A. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **74**, 868 (1991).
24. CHAIRMAN, L.H.K., CRUMMETT, W., DEGAN, J., LIBBY, R.A., TAYLOR, J.K., WENTLER, G., *Anal. Chem.* **55**, 2210 (1983).
25. RUDY, J.L. *Clin. Chem.* **35**, 509 (1989).