

LA INSTRUMENTACION QUIMICA EN EL SEGUIMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS PRODUCTOS FARMACEUTICOS

*Luz Stella Ospina de Nigrinis**

1. INTRODUCCION

La relación entre el desarrollo de la instrumentación empleada para el análisis químico y el avance de la investigación en las ciencias puras y aplicadas, particularmente de las **Ciencias Químico Farmacéuticas**, en todas sus áreas, es bastante clara.

La búsqueda permanente de nuevos fármacos, el conocimiento de la estabilidad, de su biodisponibilidad, de los procesos de biotransformación, del mecanismo de acción, de los efectos secundarios, de la toxicidad, requiere de una instrumentación con la cual se logre una información más exacta y precisa, a partir de cantidades mínimas de muestra, es decir, que se necesita estar cada vez más cerca de la especificidad de la respuesta con métodos suficientemente sensibles.

A su vez ha sido necesario el desarrollo de la teoría de los principios fundamentales, en los cuales se basan los sistemas de la medida instrumental, cuyos comienzos datan desde principios de siglo, como los trabajos de **Tswett** en el campo de la cromatografía, hasta los desarrollos de los sistemas más modernos, los cuales

incluyen la introducción del microprocesador y la automatización del instrumental más reciente

Este trabajo científico permanente y continuado, ha sido siempre reconocido por la comunidad científica, otorgándoles a los investigadores ese galardón tanpreciado, como lo es el **Premio Nobel** en las áreas de la física y de la química. Se puede mencionar como ejemplo a **Bloch** y **Purcell** por sus aportes en el campo de la **resonancia magnética nuclear**, a **Jaroslav Heyrovsky** en el campo de la **polarografía** y a **Martín y Syngé** por sus investigaciones en la **cromatografía de gases**.

Todos estos avances en el desarrollo de la instrumentación, hacen posible la separación de los componentes de una muestra y la determinación de las propiedades físicas y químicas de las moléculas químicamente puras, para establecer de manera inequívoca su estructura.

Se trata entonces de desarrollos científicos que se retroalimentan: las ciencias físicas, químicas, biológicas y de la salud requieren de instrumentos cada vez más sofisticados y precisos, a lo cual responde el desarrollo y el avance de la instrumentación; y a su vez estos logros permiten profundizar y avanzar cada vez más en las ciencias puras y aplicadas.

* Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Apartado Aéreo 14490. Bogotá.

2.LA INSTRUMENTACION Y LAS CIENCIAS QUIMICO FARMACEUTICAS

Es bien sabido que la respuesta instrumental, no es otra cosa que la medida de una propiedad física propia de la estructura de la molécula químicamente definida o de un derivado determinado a partir de ésta y que la magnitud de la respuesta es función de su concentración.

Sin temor a equivocaciones, se puede afirmar que el análisis químico instrumental, está involucrado en la investigación necesaria para que los medicamentos cumplan con el postulado inherente a su función, en cuanto a que deben ser eficaces y seguros, lo cual está relacionado con su calidad.

El proceso empieza con el diseño y el desarrollo de la molécula del fármaco, continúa con su síntesis química o biotecnológica, la investigación preclínica y clínica, el diseño, el desarrollo y la producción del medicamento, el seguimiento continúa hasta cuando llega al paciente y prosigue en la etapa de posmercadeo. Se trata de un proceso dinámico, lo cual contribuye al seguimiento de la calidad del medicamento.

2.1 DESARROLLO DE UN METODO DE ANALISIS

Para diseñar o modificar un método de análisis, es fundamental conocer los aspectos relacionados con la instrumentación que se va a utilizar, con la naturaleza del compuesto objeto de estudio y con las características de la muestra.

Con relación al instrumento, se deberá tener un conocimiento completo sobre el fundamento de su funcionamiento, la potencialidad de su uso, sus limitaciones y sobre la calibración del mismo.

Respecto a la molécula, se deberá allegar la

información completa sobre las propiedades fisicoquímicas inherentes a su estructura. Todas las moléculas orgánicas, alifáticas o aromáticas, pueden absorber de manera selectiva radiación electromagnética, porque en los enlaces sencillos, dobles o triples, de su estructura carbonada y de los grupos funcionales están comprometidos los electrones σ , π y además los electrones n de valencia o electrones no compartidos, los cuales en condiciones experimentales determinadas, pueden ser excitados a niveles de energía superiores; además las moléculas pueden vibrar y rotar sobre su centro de gravedad. Lo anterior hace posible que las moléculas absorban energía electromagnética de la región ultravioleta (UV), visible (VIS) e infrarroja (IR). De acuerdo a sus características moleculares, los compuestos químicamente definidos además de absorber energía pueden transformarla y emitirla, dando lugar al fenómeno de la luminiscencia, siendo la fluorescencia el más importante desde el punto de vista analítico.

La gran mayoría de los fármacos son de naturaleza aromática o heterocíclica, con grupos funcionales donadores o aceptores de electrones, los cuales influyen las propiedades fisicoquímicas de la molécula y a la vez pueden reaccionar químicamente, para dar lugar a derivados con el objeto de incrementar la especificidad y la sensibilidad del método.

La aromaticidad de una molécula, relacionada con su densidad electrónica, puede ser modificada de diferente manera, lo cual incide en la absorción de la energía al UV y en la fluorescencia de las moléculas. Los factores que pueden producir estas modificaciones son: La fusión de núcleos bencénicos a núcleos bencénicos, la fusión de núcleos bencénicos a núcleos heterocíclicos, lo cual incrementa la absorción al ultravioleta y la fluorescencia.

Algunos grupos funcionales como: nitro, carbonilo, azometilo, nitrilo, carboxilo, halógenos, tienden a disminuir la absorción al ultravioleta y la fluorescencia de la molécula, debido a la deslocalización de los electrones en los núcleos bencénicos o heterocíclicos. Los grupos funcionales cromóforos donadores de electrones como amino, dimetilamino, cadenas alifáticas, alcoxi, fenoxi, tienden a incrementar la absorción al UV y la fluorescencia de la molécula, por incremento de la densidad electrónica del núcleo aromático.

Esto que se ha señalado de manera sencilla, permite ubicarse en los **métodos espectrofotométricos de absorción al UV, Vis e IR** y en el **método de absorción y de emisión: La espectrofluorometría**.

Pero además de la estructura carbonada, de los grupos funcionales, de las transiciones electrónicas y de la vibración y de la rotación molecular, los núcleos de algunos átomos, dependiendo de su espín nuclear, como el H y el C^{13} , cuando se colocan en un campo magnético determinado, tienen la propiedad de absorber radiaciones de una determinada radiofrecuencia y dependiendo del entorno de estos átomos en la molécula, dan lugar a los **espectros de resonancia magnética nuclear** protónica o de C^{13} , muy importantes para la diagnosis estructural.

De igual manera las moléculas en condiciones experimentales apropiadas, a través de diferentes métodos (impacto de electrones, ionización química) pueden ser convertidas en iones gaseosos, los cuales son separados en función de su masa y de su carga originando los **espectros de masa**, de los cuales se obtiene información valiosa para su identificación, además del peso molecular.

La asimetría molecular ofrece la posibilidad de utilizar métodos ópticos como la **polarimetría**, el **dicroísmo circular** y la **dispersión óptica rotatoria**. Los dos últimos permiten obtener información estructural útil, respecto a la configuración de los sustituyentes angulares en los anillos y a la localización de algunos grupos funcionales, principalmente en compuestos como esteroides, terpenos y otros.

Dadas las características electroquímicas de las moléculas, éstas pueden ser oxidorreducibles y como tales, pueden analizarse empleando **métodos electrométricos** como la **polarografía**.

Cualquiera de las posibles alternativas planteadas, está limitada en la práctica por su **especificidad** y su **sensibilidad** y para que la información obtenida tenga utilidad, los compuestos a analizar deben estar puros.

El gran aporte de los métodos de separación, en particular de los **métodos cromatográficos** en todas sus modalidades, es el poder separar y cuantificar simultáneamente los componentes de una muestra y en el caso de un medicamento, la muestra puede ser el fármaco y sus metabolitos, el fármaco y sus productos de degradación, el fármaco y sus excipientes o el fármaco y sus contaminantes.

Una consecuencia de la gran importancia de los **métodos cromatográficos en todas sus modalidades** y de acuerdo a los últimos avances, ha sido la adopción a partir de los últimos diez años, de un gran número de ensayos y de valoraciones cromatográficas, para evaluar la pureza y para la cuantificación de varios fármacos y excipientes.

En el caso particular de la Farmacopea Americana, en su última edición se han adicionado tres

capítulos nuevos sobre: **Impurezas Ordinarias, Impurezas en Compuestos Oficiales e Impurezas Orgánicas Volátiles**; éste último oficializado en el suplemento N° 3 de julio de 1990

Como en los demás métodos instrumentales, es necesario conocer las propiedades físicas y químicas de las moléculas, con el objeto de seleccionar la modalidad más apropiada (**cromatografía en capa fina, cromatografía en capa fina de alta eficiencia, cromatografía líquida de alta eficiencia o cromatografía de gases**) de acuerdo al mecanismo por el cual ocurre la separación: adsorción, reparto, intercambio iónico o filtración molecular. Cualquiera que sea la modalidad, la finalidad es la misma; lograr la separación de los componentes de la muestra.

Una vez separados los compuestos, existe toda una gama de posibilidades para su detección de acuerdo a la propiedad que se desee medir y así se dispone de diferentes clases de detectores **específicos o universales, destructivos o no destructivos**. Se tiene así los espectrofluorodensitómetros, para la cromatografía en capa fina; detectores para el UV, el Vis con arreglo de diodos, detector espectrofluorométrico, electroquímicos y de índice de refracción para la cromatografía líquida de alta eficiencia o detectores de conductividad térmica, de ionización como los de llama de hidrógeno, de captura de electrones, para nitrógeno y fósforo, o de ionización química o de impacto de electrones como el espectrómetro de masas para la cromatografía de gases.

Si la elección de los posibles métodos instrumentales, para la identificación de la molécula están relacionados con su estructura, la elección del método para la cuantificación, además está limitado por la especificidad y la sensibilidad

del mismo y éste en buena parte está condicionado a la complejidad de la muestra y a la concentración de los componentes.

A partir de la información sobre la instrumentación, sobre la molécula objeto de estudio y sobre las características de la muestra, se diseña el método de análisis y se comprueba y se demuestra experimentalmente que funciona para lo cual fue diseñado, es decir que el método debe ser **validado**.

La necesidad de estar cada vez más cerca del método óptimo, específico, sensible, exacto y preciso con el objeto de garantizar **la eficacia y la seguridad del medicamento**, a través del seguimiento de la calidad, exige que continuamente se esté investigando, revaluando y adecuando las metodologías establecidas.

Con el avance en el desarrollo de la instrumentación, de la industria electrónica y de la sistematización, ésta es cada vez más sensible y automatizada, se dispone de varias alternativas posibles y se puede afirmar que en la actualidad, está al alcance del investigador la instrumentación apropiada, para que de una manera minuciosa pueda separar, identificar y cuantificar cualquier compuesto.

3. VALIDACION DEL METODO DE ANALISIS

El diseño o la adecuación del método de análisis como resultado del estudio minucioso de la molécula del fármaco, del producto o productos de degradación, de los productos de biotransformación, de los contaminantes, de los posibles residuales de síntesis, de los excipientes, de las condiciones de la muestra y del instrumental apropiado, es solamente parte del problema. Para que el método pueda ser utilizado en el seguimiento de la calidad de los medi-

camentos es esencial demostrar experimentalmente, que el método es consistente y que funciona para las aplicaciones analíticas diseñadas, es decir, que el método debe ser **validado**. El método validado para un compuesto en una muestra determinada, no garantiza que pueda utilizarse indiscriminadamente para cualquier clase de muestra.

Las variables analíticas que configuran el proceso de validación, generalmente son: la especificidad o selectividad, la cantidad mínima detectable o límite de detección, la cantidad mínima cuantificable o límite de cuantificación, la sensibilidad, la exactitud, la precisión, la linealidad y la solidez o robustez del método.

Existen varios niveles de validación del método, el más simplificado es aquel en el cual interviene un experimentador, un sólo laboratorio y el mismo experimentador prepara sus propias muestras, hasta el nivel más complejo, en el cual se hace la validación a través de estudios colaborativos entre varios laboratorios, varios experimentadores, con muestras divididas y durante varios días.

Se conocen varios criterios y formas de evaluar cada una de las variables que permiten validar el método; cualquiera que sea la modalidad, debe ser exigente y rigurosa y deberá definir de manera clara y precisa el procedimiento a seguir, los parámetros estadísticos y los criterios de aceptación.

Dada la variabilidad de las respuestas que pueden obtenerse, en cada uno de los procedimientos seguidos para la validación del método, es necesario hacer una evaluación estadística de los resultados obtenidos, la cual dependerá del diseño experimental utilizado. Un buen diseño experimental, debe permitir reducir al mínimo

las variables y su influencia debe ser igual para todas las unidades experimentales.

Es pertinente señalar las limitaciones de las conclusiones estadísticas, recordando los dos errores que se pueden cometer:

1. Error de tipo I o Error α , el cual consiste en rechazar una hipótesis verdadera. La probabilidad para este error debe ser fijada por el investigador y generalmente se trabaja con probabilidades de error del 5% ($p = 0,05$ o $\alpha = 0,05$) o del 1% ($p = 0,01$ o $\alpha = 0,01$).

2. Error de tipo II o Error β , el cual consiste en aceptar una hipótesis falsa. La probabilidad de cometer este error es desconocida para el investigador y se incrementa al disminuir el error α .

Al iniciar el proceso de validación de cualquiera de los atributos del método, el investigador definirá o planteará el procedimiento en los siguientes términos:

1. Proponer la hipótesis de nulidad.
2. Fijar la probabilidad de error de tipo α .
3. Realizar el experimento.
4. Desarrollar los cálculos matemáticos para el estadístico relacionado con la hipótesis.
5. Comparar el estadístico con su distribución normal y observar si cae en la zona de rechazo.
6. Rechazar o no rechazar la hipótesis.

3.1 VALIDACION DE LOS ATRIBUTOS QUE DEFINEN EL METODO

3.1.1 ESPECIFICIDAD O SELECTIVIDAD

Un método analítico es específico, cuando la respuesta obtenida corresponde exclusivamente

te al compuesto que se está detectando y cuantificando (fármaco, producto de degradación, metabolitos, contaminantes, residuales de síntesis, impurezas, otros), es decir, que no se presenta ninguna clase de interferencia por parte de los demás componentes de la muestra.

3.1.2 CANTIDAD MINIMA DETECTABLE O LIMITE DE DETECCION

La cantidad mínima detectable por un método analítico, hace referencia a la concentración más baja del compuesto en estudio, que es posible detectar con certeza, cuando se utiliza el procedimiento analítico completo. El valor de la respuesta de la concentración mínima detectable, de acuerdo a varios criterios, corresponde a la media de la respuesta del blanco (ruido), cuando se le aplica el método completo, más tres desviaciones estándar.

3.1.3 CANTIDAD MINIMA CUANTIFICABLE O LIMITE DE CUANTIFICACION

Es la cantidad mínima de compuesto que se puede cuantificar a partir de la muestra, cuando se aplica el método completo. La cantidad mínima cuantificable debe cumplir con los conceptos de exactitud y de precisión. La cantidad mínima cuantificable corresponde a la concentración cuya respuesta, después de haber aplicado el método completo a la muestra, es igual a la media de la respuesta del blanco (ruido) más diez desviaciones estándar.

3.1.4 SENSIBILIDAD

La sensibilidad de un método es una función de la concentración, está determinada por la pendiente de la curva de calibración (respuesta instrumental Vs. concentración) y corresponde a la variación en la respuesta cuando hay un pequeño cambio en la concentración.

3.1.5 EXACTITUD

La exactitud de un método analítico, se define como la diferencia entre el valor verdadero de la concentración aceptado como referencia y el valor obtenido experimentalmente. La exactitud del método está asociada a los errores sistemáticos. Existen varios criterios para el cálculo de la exactitud, entre los cuales es muy conocido el criterio de W. J. Younden. Se requiere disponer de varias muestras con cantidades conocidas del compuesto en estudio y después de aplicar el método se grafican los resultados, así: cantidad encontrada Vs. cantidad adicionada. Deberá obtenerse la línea de regresión calculada por el método de mínimos cuadrados con pendiente $\cong 1$ e intercepto $\cong 0$. El estudio estadístico de esta variable analítica, consiste en el análisis de varianza (ANOVA) para la regresión lineal, la prueba de convergencia al origen (intercepto $\cong 0$ la prueba para la pendiente (pendiente $\cong 1$). Si el método tiene dos sesgos, es decir, que la recta de mejor ajuste tiene un intercepto significativamente diferente de cero y una pendiente significativamente diferente de uno, debe considerarse como inadecuado.

Otra forma de evaluar la exactitud, es mediante el cálculo del porcentaje de recuperación, adicionando cantidades conocidas del compuesto (fármaco, producto de degradación, producto de biotransformación, residuales, otros) a un blanco (reactivo o reactivos y excipientes o reactivos y componentes endógenos) se desarrolla el método por el mismo experimentador y se obtienen las respuestas. El cociente de la cantidad encontrada y de la cantidad adicionada se expresa en porcentaje. Se conoce este valor como porcentaje de recuperación. Se calcula el coeficiente de variación CV, la media de todos los valores (10) y los límites de confianza para

un error α de 0,05 ó 0,01 y para $n-1$ grados de libertad.

Es deseable que el porcentaje de recuperación sea lo más cercano al 100%, sin embargo, no hay nada establecido sobre cual debe ser este valor. Cada experimentador, dependiendo de la clase de análisis (análisis de trazas, límites de tolerancia, otros) fija el valor deseable. Lo importante es que el porcentaje de recuperación sea reproducible (preciso) cada vez que se aplica el método. En la literatura, se encuentran otros métodos para la evaluación de la exactitud.

3.1.6. PRECISION

La precisión de un método analítico está asociada a los errores aleatorios y está dada por el grado de concordancia entre los resultados individuales, (reproducibilidad del método) cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos provenientes de una muestra homogénea. Corrientemente se expresa como **desviación estándar o coeficiente de variación o desviación estándar relativa**. Es una medida del grado de reproducibilidad del método analítico bajo condiciones de operación normales. Los ensayos deben ser análisis independientes de muestras (alícuotas) aplicando todo el procedimiento analítico desde la preparación de la muestra hasta el cálculo final.

3.1.7. LINEALIDAD

La linealidad se define como la propiedad del método para dar respuestas que son directamente, o a través de una transformación matemática, proporcionales a la concentración del compuesto analizado, dentro de un intervalo (rango) de concentraciones.

La linealidad de un sistema se estudia construyendo una curva de calibración, utilizando varias concentraciones (tres o más) a partir de la

misma solución patrón, trabajando por lo menos dos réplicas de cada dilución (concentración).

La linealidad del método se estudia con blancos (reactivos y excipientes, o reactivos y componentes endógenos), adicionados del compuesto en estudio (fármaco, productos de degradación, metabolitos, otros), por lo menos tres concentraciones diferentes, por triplicado cada una. se traza la recta de mejor ajuste por el método de mínimos cuadrados. La ecuación de la recta es $y = a + bx$ en la cual $\alpha \cong 0$. El estudio estadístico de esta variable analítica tanto para el sistema como para el método, consiste en realizar el análisis de varianza para la regresión lineal y que la pendiente b es significativamente diferente de cero (hay regresión). Además la recta debe ser convergente al origen, es decir que el valor del intercepto a no es significativamente diferente de cero, para lo cual se debe plantear la hipótesis para la ordenada al origen

3.1.8. SOLIDEZ O ROBUSTEZ

La solidez o robustez del método analítico se define como el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos para las mismas muestras bajo variadas condiciones, como diferentes experimentadores, con diferentes instrumentos, con diferentes lotes de reactivos, a diferentes temperaturas, a diferentes pH, etc.

El estudio estadístico para esta variable analítica consiste en realizar un análisis de varianza correspondiente a un experimento con varios factores de clasificación, con réplicas para estudiar la significancia de las fuentes de variación y el error residual.

BIBLIOGRAFIA

Box, G.E.P., Hunter W.G. and Hunter J.S. Estadística para investigadores. Introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción

- de modelos. Editorial Reverté, S.A., Barcelona, (1988).
- Chafetz, L. **Stability indicating assay methods for drugs and their dosage-forms (Review Article)** J. Pharm. Sci. 60(3): 335-345, (1971).
- Conacher, H.B.S. **Validation of methods used in crisis situations: Task Force Report.** J. Assoc. Off. Anal. Chem. 73(2): 332-334, (1990).
- Connors, K.A., Amidon, G.L. and Stella Valentino, J. **Chemical stability of pharmaceuticals.** Editorial John Wiley and Sons, New York, (1986).
- Deyl, Z., De Silva, J.A.F. **Drug level monitoring** J. Chrom. Biomed. Appl., 340, may 10: 1-496, (1985).
- Guideline for submitting samples and analytical data for methods validation FDA, Center for Drugs and Biologics Department of Health and Human Services.** February, Rockville, MD, (1987).
- Mollica, J.A., Ahuja, S. and Cohen, J. **Stability of pharmaceuticals (Review Article)** J. Pharm. Sci. 67 (4):443-465, 1978. Parker, G. A.
- Parker G.A. **Validation of methods used in the Florida Department of Agriculture and consumer Services' Chemical residue Laboratory.** J. Assoc. Off. Chem. Anal. 74(5): 868-871, (1991).
- Pharmacopoeial Forum** The Journal of drugs standards development and official compendia revision, Vol 17Nº1, (1991).
- Skoog, D.A. and West, D.M. **Análisis instrumental.** Editorial Interamericana, México, D.F., (1984).
- Taylor, J.K. **Validation of analytical methods** Anal. Chem. 55(6): 600A-608A, 1983
- The United States Pharmacopoeia XXII Ed.** Pharmacopoeia Convection Inc. Washington, D.C., (1990).
- Suplementos I, II, III, IV, V, VI.** The United States Pharmacopoeia XXII Ed. Pharmacopoeia Convection Inc. Washington, D.C., (1990).
- Validation of compendial methods.** USP XXII: 1710-1712.
- Williams, D.R. **Minimum criteria for validation of analytical methods.** J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69(3): 432, (1986).
- Younden, W.J. **Accuracy of analytical procedures.** J. Assoc. Off. Anal. Chem. 45(1): 169-173, (1962.)