

## Validación de un método analítico para la valoración del inyectable liofilizado Amfotericina B

Validation of an analytical method for the titration of injectable lyophilized Amphotericin B

Thais Valdés Parra<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0001-8115-2943>

Carlos Rafael Romeu Carballo<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7598-9069>

Gisela Ramírez Torrez<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-8510-5295>

<sup>1</sup>Empresa Laboratorios AICA, Unidad de Desarrollo e Investigación (UDI), Grupo de Nuevas tecnologías y Citostáticos. Playa, La Habana, Cuba.

\*Autor para correspondencia: [tvaldesp91@gmail.com](mailto:tvaldesp91@gmail.com)

### RESUMEN

**Introducción:** El inyectable liofilizado Amfotericina B se utiliza como antifúngico, contra un amplio espectro de hongos.

**Objetivo:** Validar un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución, para la valoración del inyectable liofilizado Amfotericina B.

**Métodos:** El método se basó en la separación del principio activo a través una columna cromatográfica Apollo-C18 (5 µm) (250 x 4,6 mm), con detección ultravioleta a 380 nm, para lo cual se usó una fase móvil compuesta por una mezcla de 650 mL de Acetonitrilo: Metanol: Tetrahidrofurano (39:17:9) y 350 mL de Buffer de EDTA (2,5 mmol/L), con una velocidad de flujo de 1,5 mL/min. La curva de calibración se realizó en el intervalo de 0,01 mg/mL a 0,03 mg/mL, (del 50 % hasta el 150 % de la cantidad propuesta en la técnica).

**Resultados:** El método fue lineal, con un coeficiente de correlación igual a 0,9998; la prueba estadística para el intercepto y la pendiente se consideró no significativa. Se obtuvo un recobrado del 100,48 % en el intervalo de concentraciones estudiados y las pruebas de Cochran y t de Student resultaron no significativas. El coeficiente de variación en el estudio de la repetibilidad fue igual a 0,07 % para las 6 réplicas ensayadas, mientras que en los análisis de la precisión

intermedia las pruebas de Fischer y t de Student fueron no significativas. En el estudio de especificidad no se observaron interferencias de picos adicionales cerca del tiempo de retención del producto principal. El método analítico resultó lineal, preciso, específico y exacto en el intervalo de concentraciones estudiadas.

**Conclusiones:** El método analítico validado por cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación del principio activo del inyectable liofilizado Amfotericina B, resultó ser lineal, preciso, exacto y específico, en el intervalo de concentraciones establecido entre 0,01 mg/mL y 0,03 mg/mL.

**Palabras clave:** HPLC/métodos; Amfotericina B; validación.

## ABSTRACT

**Introduction:** The injectable lyophilized Amphotericin B is used as an antifungal against a wide spectrum of fungi.

**Objective:** Validate an analytical method by high-performance liquid chromatography for the titration of the injectable lyophilized Amphotericin B.

**Methods:** The method was based on the separation of the active substance through an Apollo-C18 chromatographic column (5  $\mu$ m) (250 x 4.6 mm), with ultraviolet detection at 380 nm, for which a mobile phase composed of a mixture of 650 mL of Acetonitrile: Methanol: Tetrahydrofuran (39:17:9) and 350 mL of EDTA Buffer (2.5 mmol/L) was used, with a flow rate of 1.5mL/min. The calibration curve was performed in the range of 0.01 mg/mL to 0.03 mg/mL, (from 50% to 150% of the amount proposed in the technique).

**Results:** The method was linear, with a correlation coefficient equal to 0.9998; the statistical test for interception and slope was considered non-significant. A recovery of 100.48% was obtained in the range of concentrations studied and the Cochran and Student's t tests were not significant. The coefficient of variation in the repeatability study was equal to 0.07% for the 6 replicates tested, while in the intermediate precision analyses the Fischer and Student's t tests were not significant. In the specificity study, no interference from additional peaks was observed near the retention time of the main product. The analytical method was linear, precise, specific and accurate in the range of concentrations studied.

**Conclusions:** The analytical method validated by high-performance liquid chromatography for the quantification of the active ingredient of the injectable lyophilized Amphotericin B, turned out to be linear, precise, accurate and specific, in the range of concentrations established between 0.01 mg/mL and 0.03 mg/mL.

**Keywords:** HPLC/methods; Amphotericin B; validation.

Recibido: 21/06/2021

Aceptado: 14/07/2021

## Introducción

Las enfermedades ocasionadas por hongos afectan a más de un billón de personas alrededor del mundo y el rango de severidad va de asintomáticos a infecciones sistémicas con peligro para la vida.<sup>(1,2)</sup> La Amfotericina B (AmB) es un antibiótico poliénico aislado de cultivos de *Streptomyces nodosus*, introducido en el mercado desde 1958.<sup>(3)</sup> Este fármaco presenta baja resistencia y es efectivo contra un amplio espectro de infecciones micóticas: aspergillosis, candidiasis, blastomicosis, paracoccidioidomicosis, coccidioidomicosis, criptococcosis, entre otras.<sup>(4,5)</sup> A pesar de ello no se emplea usualmente debido a su alta toxicidad y porque provoca varios efectos adversos en altas dosis.<sup>(6)</sup> Su actividad antifúngica consiste en ocasionar poros en la membrana celular de los hongos mediante su unión al ergosterol, componente específico de dichas membranas. Esto ocasiona una fuga incontrolada de iones que termina induciendo la muerte celular.<sup>(7)</sup>

El método reportado en la Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP por sus siglas en inglés) para valorar la Amfotericina B es la valoración de antibióticos, técnica que por sus características conlleva varios días de preparación y análisis. Por su parte, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC en inglés) es una técnica de fácil manipulación en el Laboratorio de investigación, desarrollo e innovación (I+D+i); donde se hace necesario optimizar el tiempo de análisis de los inyectables, cuantificando con exactitud el principio activo del producto para los estudios de estabilidad. Por ello, fue necesario desarrollar un método por esta técnica que permita cuantificar la Amfotericina B y detectar la presencia de sus productos de degradación. Para el mejor cumplimiento de este acápite el método analítico desarrollado fue validado, en busca de un alto grado de confiabilidad de los resultados obtenidos por la técnica y seguridad total en el método analítico.

El objetivo fundamental de la Empresa Laboratorios AICA<sup>+</sup> es la fabricación de Medicamentos inyectables bajo el cumplimiento estricto de las Buenas Prácticas de Fabricación y las Buenas Prácticas de Laboratorio. De ahí que el objetivo del presente estudio sea validar un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para la valoración del inyectable liofilizado Amfotericina B.

## Métodos

Se utilizó un patrón de referencia química de Amfotericina B USP, el cual fue analizado por el método cromatográfico desarrollado en la unidad, a partir de bibliografía consultada, para la valoración del producto inyectable Amfotericina B. Se estudiaron los lotes 6001, 6004 y 6005 elaborados en la UEB Julio Trigo

perteneciente a la Empresa Laboratorios AICA<sup>+</sup>. Los lotes cumplieron con las especificaciones de calidad establecidas para el control de la calidad de los inyectables.

Todos los reactivos utilizados fueron de grado HPLC. En el ensayo se usó un cromatógrafo (Knauer) con detector UV/VIS (Knauer) ajustado a 383 nm, un inyector con un loop de 100  $\mu$ L y un software Clarity Chrom versión 6,1,0,130 (Knauer GmbH, 2009). La separación se realizó isocráticamente utilizando una columna Apollo-C 18 (5  $\mu$ m) (250 x 4,6 mm) y un flujo de 1,5 mL/min. La fase móvil óptima, consistió en una mezcla de 650 mL de Acetonitrilo: Metanol: Tetrahydrofurano (39:17:9) y 350 mL de Buffer de EDTA (2,5 mmol/L). Se inyectaron 100  $\mu$ L y el tiempo total de la corrida fue de 10 min. Parámetros de aptitud y adecuabilidad del sistema: coeficiente de variación (CV)  $\leq$  2 %, resolución  $\geq$  2, número de platos teóricos  $\geq$  1500 y simetría de 0,8 - 1,2.

La solución de referencia se obtuvo disolviendo 10 mg del patrón de referencia de la Amfotericina B, en 10 mL de metanol, posteriormente se transfirieron a un matraz de 100 mL, y se llevó a volumen con el propio disolvente. Por último, se tomó una alícuota de 2 mL, se transfirió a un volumétrico de 10 mL y se enrasó con fase móvil, para lograr una solución con una concentración final de 0,02 mg/mL.

En la preparación de la solución de ensayo para la valoración, se tomaron 5 bulbos de la muestra, que fueron reconstituidos con 2 mL de agua, posteriormente se vertieron en un volumétrico de 100 mL y se llevó a volumen con el propio disolvente. Se tomó una alícuota de 4 mL que se vertió en un volumétrico de 100 mL y llevó a volumen con metanol. Por último, se tomó una alícuota de 2 mL que se transfirió a un volumétrico de 10 mL y se enrasó con fase móvil, para lograr una solución con una concentración final de 0,02 mg/mL.

## Validación del método analítico

La validación fue realizada según la categoría I (USP-42) y la Regulación 40-2014 del Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED), para la validación de métodos de análisis se evaluaron los parámetros que a continuación se describen:<sup>(8,9,10)</sup>

- Linealidad: para el análisis de la linealidad se realizó el modelo de 3 determinaciones para 5 concentraciones diferentes: 50 %, 75 %, 100 %, 125 %, y 150 %. Se determinó la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación, la prueba de significación estadística del pendiente  $S_b$  rel (%),

los coeficientes de variación de los factores de respuesta y el ensayo de proporcionalidad, dos días.

- Precisión intermedia: para el estudio de la precisión intermedia se aplicó el modelo de 6 réplicas y 2 analistas, 2 días. Con ellas se determinaron los valores medios, la desviación estándar y el coeficiente de variación.
- Repetibilidad: para el análisis de repetibilidad se realizó el modelo de 3 réplicas para 3 concentraciones diferentes: 75 %, 100 %, 125 %. Se aplicó la prueba de Fisher y de la t de Student para determinar si existían diferencias significativas entre los resultados al variar las condiciones de análisis.
- Exactitud: para el ensayo de la exactitud se utilizaron 5 valores de concentración que correspondieron al 50 %, 75 %, 100 %, 125 % y 150 %. Se determinaron el porcentaje de recuperación, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Se aplicó además el ensayo de Cochran con vistas a comprobar si la variación de la concentración producía diferencias significativas en los resultados y la prueba de la t de Student para determinar diferencias significativas entre la recuperación media y el 100 %.
- Especificidad: para el estudio de especificidad se analizó la sustancia de referencia de Amfotericina B, un placebo, las muestras del producto terminado en forma de inyectable liofilizado y muestras sometidas a condiciones drásticas, como hidrólisis básica (con hidróxido de sodio 0,1 N), hidrólisis ácida (con ácido clorhídrico 0,1 N), oxidación (con peróxido de hidrógeno) y termólisis. Criterio de aceptación: no debían obtenerse señales del placebo y de los productos de degradación en la zona de elusión del principio activo. Las áreas bajo las curvas del patrón y de la del producto terminado debían ser similares.

## Resultados

Como resultados de los estudios de la linealidad del sistema se obtuvo que el coeficiente de regresión lineal fue de 0,9998 y el coeficiente de variación del factor de respuesta resultó igual a 1,14 %.

En el estudio de realizado precisión intermedia, la media obtenida fue del 100,04 % y el coeficiente de variación fue del 0,07 %. Los valores obtenidos de F y t fueron menores que los valores tabulados, para cada uno de los analistas y días estudiados, para un 95 % de confianza. Los resultados del estudio de repetibilidad del método aparecen reportados en la tabla 1.

**Tabla 1 - Resultados del estudio de repetibilidad**

Concentración (%)	Resultados (%)	Criterios estadísticos
Bajo (75)	73,74	□ = 74,00 CV = 0,74
	73,64	
	74,63	
Medio (100)	100,10	□ = 100,04 CV = 0,07
	100,05	
	99,96	
Alto (125)	126,81	□ = 126,83 CV = 0,44
	127,41	
	126,29	

En la tabla 2, aparece reportado los resultados del estudio de exactitud. La recuperación media ( $R_{tot}$ ) fue de 100,48 % y los valores experimentales de  $t$  y  $G$  calculados (1,40 y 0,5098 respectivamente) fueron menores que los valores tabulados ( $t_{tabulada}$  2,14 y  $G_{tabulada}$  0,7977), para un 95 % de confianza. La desviación estándar media ( $S_{tot}$ ) fue de 1,34.

**Tabla 2 - Resultados del estudio de exactitud**

Cantidad adicionada (%)	Cantidad recuperada (%)	Recobrado (%)	Criterios estadísticos
50	51,16	102,33	□ = 50,25 $t_{exp} = 0,54$ $t_{tab} = 4,30$
	49,59	99,19	
	50,01	100,01	
75	73,74	98,31	□ = 74,00 $t_{exp} = 3,17$ $t_{tab} = 4,30$
	73,64	98,18	
	74,63	99,51	
	100,10	100,10	
100	100,05	100,05	□ = 100,04 $t_{exp} = 0,90$ $t_{tab} = 4,30$
	99,96	99,96	
	126,81	101,45	
125	127,41	101,93	□ = 126,84 $t_{exp} = 5,68$ $t_{tab} = 4,30$
	126,29	101,03	
	152,08	101,39	
150	152,63	101,75	□ = 152,62 $t_{exp} = 8,55$ $t_{tab} = 4,30$
	153,14	102,09	

$$R_{tot} = 100,48; S_{tot} = 1,34; CV = 1,33; t_{experimental} = 1,40; t_{tabulada} = 2,14$$

En los resultados obtenidos en el ensayo de especificidad no se observaron señales en la zona de interés en el cromatograma correspondiente placebo. En la figura 1 se muestran los cromatogramas correspondientes al patrón y a la muestra sin degradar.

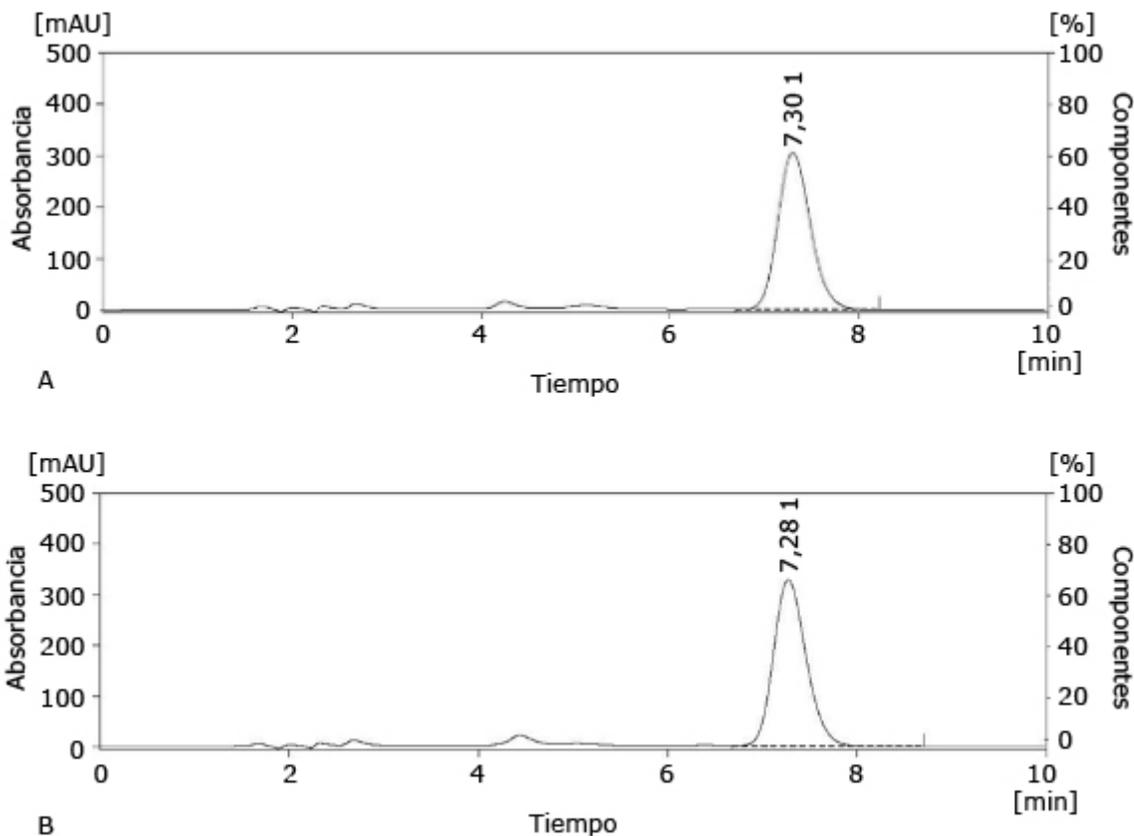


Fig. 1- Cromatogramas correspondientes a: A) patrón de referencia, B) producto inyectable liofilizado Amfotericina B.

En la figura 2 se observan los cromatogramas correspondientes a las muestras sometidas a condiciones drásticas de: hidrólisis básica (C), hidrólisis ácida (D), a la oxidación (E) y a altas temperaturas (F). La aparición de picos secundarios es atribuible a posibles productos de degradación, los que al compararlos con la señal del pico principal obtenida en los cromatogramas del patrón de referencia (figura 1 A) y de la muestra de Amfotericina B en el inyectable liofilizado (figura 1 B), demuestran que no interfieren en la determinación del principio activo.

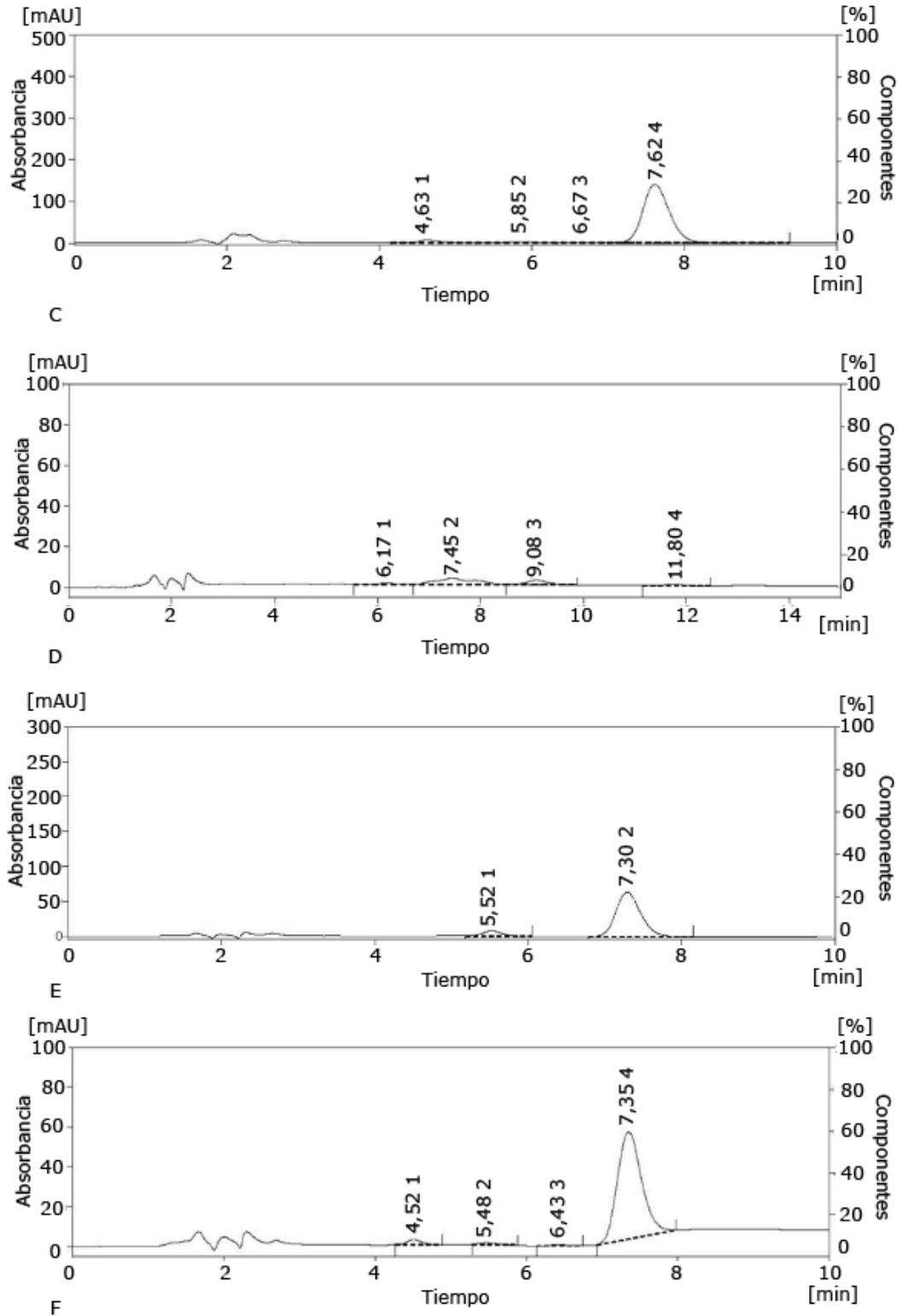


Fig. 2- Cromatogramas correspondientes a las muestras sometidas a: C) hidrólisis básica, D) hidrólisis ácida, E) oxidación y F) termólisis.

## Discusión

En los resultados del estudio de linealidad se obtuvieron valores de coeficientes de regresión y de determinación (0,9998 y 0,9994), superiores a los establecidos en la Regulación 40 de 2014 del CECMED<sup>(6)</sup> (0,99 y 0,98 respectivamente). El valor del coeficiente de correlación obtenido, cercano a la unidad demuestra la existencia de correlación con una probabilidad elevada, así como el grado de relación entre las variables concentración y respuesta. También el coeficiente de variación de los factores de respuesta (1,14 %) fue inferior al normado como máximo para estos indicadores (5 %), este factor se considera un estimador puntual que permite caracterizar la variabilidad. El valor obtenido del CV permitió demostrar que existe variabilidad en la relación respuesta y concentración para cada nivel evaluado. El intervalo de confianza del intercepto incluye al cero, lo que permite excluir la significación del error del intercepto. Los resultados obtenidos muestran que se cumple con los test requeridos por lo que se demuestra que hay linealidad y proporcionalidad en el rango de concentraciones escogidas.

Los valores que se obtienen en el estudio de precisión intermedia, de las pruebas de Fischer y de la t de Student, demostraron que no existían diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por los analistas en diferentes días para un 95 % de confianza, ya que los valores de F calculados (0,414 y 0,191) son menores que la F tabulada (4,060), este resultado permitió establecer que las precisiones son similares. Al realizar la prueba de la t de Student los valores calculados (1,981 y 0,768) resultaron menores que el tabulado (2,571), lo cual demostró que no existían diferencias significativas entre las medias alcanzadas, con un nivel de significación de un 95 %.

En el estudio de la repetibilidad se alcanzaron coeficientes de variación inferior al límite establecido para los métodos cromatográficos ( $CV < 2,0\%$ )<sup>(4)</sup> para las 3 concentraciones analizadas (75 %:  $CV = 0,74\%$ ; 100 %:  $CV = 0,07\%$  y 125 %:  $CV = 0,44\%$ ). Lo que demuestra que hay una variabilidad mínima en el proceso analítico y que no existen diferencias significativas entre las dispersiones independientemente de las concentraciones utilizadas.

Se obtuvieron porcentajes de recobrado dentro de los límites establecidos para los métodos cromatográficos (98 % - 102 %) y valores del coeficiente de variación menores de 2 % para cada uno de los valores de concentración trabajados. En la influencia del factor concentración sobre la variabilidad de los resultados de la exactitud al aplicar la prueba de Cochran, se obtuvo un valor de G (0,5098) menor que la G tabulada (0,7977) con un 95 % de probabilidad. Ello indica que las varianzas de las concentraciones evaluadas son equivalentes, por lo que la concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

Al realizar la prueba de significación entre la recuperación media y el 100 % de recuperación, con un coeficiente de variación del 0,35 %, se obtuvo una *t* calculada menor que la *t* tabulada.<sup>(4)</sup> Los resultados demuestran la capacidad del método para obtener valores al valor verdadero, observándose una buena exactitud. Al ser el coeficiente de variación total (1,33) menor que 3,0 no hay variabilidad entre los valores de recobro. Al no existir diferencia entre las medias de la cantidad recuperada y teórica se plantea que no hubo pérdida del producto, ni interferencia de la matriz, es decir, se recuperó el 99,99 %; por lo tanto, el método es exacto y a la vez específico.

Los resultados obtenidos durante el estudio de especificidad del método, demuestran su especificidad al no observarse interferencias de picos adicionales cerca del tiempo de retención del producto principal, ya que los productos de degradación presentan tiempos de retención diferentes al del principio activo y los excipientes no se observan. Debido a esto se consideró que el método desarrollado es específico, ya que los excipientes no interfieren en la determinación y permite cuantificar el principio activo en muestras degradadas sin interferencias de productos de degradación.<sup>(11)</sup>

Se puede concluir que el método analítico validado por cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación del principio activo del inyectable liofilizado Amfotericina B, resultó ser lineal, preciso, exacto y específico, en el intervalo de concentraciones establecido entre 0,01 mg/mL y 0,03 mg/mL.

## Referencias bibliográficas

1. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. *Journal of Fungi*. 2017;3:57. DOI: [10.3390/jof3040057](https://doi.org/10.3390/jof3040057)
2. Vallabhaneni S, Mody RK, Walker T, Chiller T. The global burden of fungal diseases. *Journal of Infectious Disease Clinics*. 2016;30:1-11. DOI: [10.1016/j.idc.2015.10.004](https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.004)
3. Nett JE, Andes DR. Antifungal agents: Spectrum of activity, pharmacology, and clinical indications. *Journal of Infectious Disease Clinics*. 2016;30:51-83. DOI: [10.1016/j.idc.2015.10.012](https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.012)
4. Montagna MT, Lovero G, Coretti C, De Giglio O, Martinelli D, Bedini A, *et al.* In vitro activities of amphotericin B deoxycholate and liposomal amphotericin B against 604 clinical yeast isolates. *Journal of Medical Microbiology*. 2014;63:1638-43. DOI: [10.1099/jmm.0.075507-0](https://doi.org/10.1099/jmm.0.075507-0)

5. Faustino C, Pinheiro L. Lipid Systems for the Delivery of Amphotericin B in Antifungal Therapy. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;12:29. DOI: [10.3390/pharmaceutics12010029](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12010029)
6. Azmat AK, Mumtaz J, Amer MA, Abdul AK. Antifungal efficacy of amphotericin B encapsulated fibrin microsphere for treating *Cryptococcus neoformans* infection in Swiss albino mice. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2016;20(4):342-48. DOI: [10.1016/j.bjid.2016.04.006](https://doi.org/10.1016/j.bjid.2016.04.006)
7. Baibek A, Üçüncü M, Short B, Ramage G, Lilienkampf A, Bradley M. Dyeing fungi: amphotericin B based fluorescent probes for multiplexed imaging. *Chemical Communication Journal*. 2021;57(15):1899-1902. DOI: [10.1039/DOCC08177A](https://doi.org/10.1039/DOCC08177A)
8. Colectivo de autores. Validation of Analytical Procedures. Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Geneva: International Conference on Harmonization ICH-Q2A; 1995.
9. The United States Pharmacopeial Convention. *Farmacopea de los Estados Unidos*. 42 ed. Estados Unidos de América NF-37. Rockville: Mack Printing; 2019.
10. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos. Resolución No 40/2014. Anexo No. I de la Regulación No 37/2012, Buenas Prácticas para Laboratorios de Control de Medicamentos. Validación de Métodos Analíticos. La Habana: CECMED; 2014.
11. Quattrocchi OA, Laba RF. Introducción a la HPLC en Aplicación y práctica. Buenos Aires: Ed. Artes Gráficas Farro, 1992 p. 106-122, 284, 302-328.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

### Contribuciones de los autores

*Thais Valdés Parra*: conceptualización; curación de datos; análisis formal; investigación; validación; visualización; redacción - borrador original; redacción - revisión y edición.

*Carlos Rafael Romeu Carballo*: conceptualización; metodología; administración de proyecto; supervisión; redacción - borrador original; redacción - revisión y edición.

*Gisela Ramírez Torres*: investigación; validación.