

## Validación del método cromatográfico para estudios de estabilidad del ciprofloxacino clorhidrato 0,2 % gota ótica

Validation of the chromatographic method for stability studies of ciprofloxacin hydrochloride 0,2 % otic drop

Lilliam Besada Moreno<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0001-5656-7071>

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

\*Autor para la correspondencia: [lilybesada97@gmail.com](mailto:lilybesada97@gmail.com); [liliamb@aica.cu](mailto:liliamb@aica.cu)

### RESUMEN

**Introducción:** El ciprofloxacino 0,2 % gota ótica es un antibiótico  $\beta$ -lactámico con amplio espectro antibacteriano.

**Objetivo:** Validar un método para evaluar el comportamiento analítico y de estabilidad de la gota ótica ciprofloxacino clorhidrato 0,2 %.

**Métodos:** El método se basó en la separación del principio activo a través de una columna cromatográfica Apollo-C18 (5  $\mu$ m) (250 x 4,6 mm), con detección ultravioleta a 277 nm, se utilizó una fase móvil compuesta por una mezcla de 870 mL de solución A (ácido fosfórico 0,025 mol/L ajustada con trietilamina a pH 3  $\pm$  0,1) y 130 mL de acetonitrilo, con una velocidad de flujo de 2,0 mL/min. La curva de calibración se realizó en el intervalo de 2,4 a 3,73  $10^{-4}$  mol/L, (de 80 % a 120 % de la cantidad propuesta en la técnica).

**Resultados:** El método fue lineal, con coeficiente de correlación 0,9998; la prueba estadística para el intercepto y la pendiente fue no significativa. Se obtuvo un recobrado de 99,9 % 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 de 0,26 % para las 6 réplicas ensayadas, en

los análisis de precisión intermedia, los valores de probabilidad obtenidos fueron superiores a 0,05, para un 95,0 % de confianza. 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 para la cuantificación del principio activo clorhidrato de ciprofloxacino 0,2 % permite que por primera vez aparezca en el Cuadro Básico de Medicamentos de Cuba un medicamento por vía ótica seguro y eficaz.

**Palabras clave:** HPLC/métodos; ciprofloxacino clorhidrato; validación.

## ABSTRACT

**Introduction:** Ciprofloxacin 0.2% otic drop is a  $\beta$ -lactam antibiotic with a broad antibacterial spectrum.

**Objective:** Validate a method to evaluate the analytical and stability behavior of the ciprofloxacin hydrochloride 0.2 % otic drop .

**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 277 nm. A mobile phase composed of a mixture of 870 mL of solution A (phosphoric acid 0.025 mol/L adjusted with triethylamine at pH 3  $\pm$  0.1) and 130 mL of acetonitrile was used, with a flow rate of 2.0 mL/min. The calibration curve was performed in the range of 2.4 to 3.73  $10^{-4}$  mol/L, (from 80% to 120% of the amount proposed in the technique).

**Results:** The method was linear, with a correlation coefficient of 0.9998; the statistical test for interception and slope was non-significant. A recovery of 99.9% 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 0.26% for the 6 replicates tested. In the intermediate precision analyses, the probability values were greater than 0.05, for a 95.0% confidence. 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 validated analytical method for the quantification of the active ingredient ciprofloxacin hydrochloride 0.2 %, allows that for the first time a safe and effective otic medicine appears in the Basic Table of Medicines of Cuba.

**Keywords:** HPLC/methods; ciprofloxacin hydrochloride; validation.

Recibido: 14/09/2021

Aceptado: 06/02/2022

## Introducción

El ciprofloxacino clorhidrato 0,2 % en gotas óticas constituye el tratamiento de elección para la otitis externa o más conocida como otitis del nadador. Este producto no se encuentra disponible en Cuba.<sup>(1,2)</sup> Las especialidades de otorrinolaringología y pediatría utilizan como terapia alternativa las soluciones oftálmicas, que no siempre son adecuadas desde el punto de vista fisiológico y terapéutico.<sup>(3)</sup> En el Cuadro Básico de Medicamentos de Cuba (CBM) no se cuenta con medicamentos para administrar por vía ótica aunque, en la red de farmacias internacionales del país, aparecen productos importados de México y el Salvador, que se comercializan y distribuyen con un abastecimiento limitado e insuficiente.<sup>(4)</sup>

En la actualidad, la Empresa Laboratorios Farmacéuticos AICA+ tiene entre sus objetivos estratégicos desarrollar e introducir nuevos productos inyectables, gotas nasales y óticas al CBM del Ministerio de Salud Pública (Minsap) y encamina sus objetivos hacia la investigación y desarrollo de gotas óticas. Para eso se aprovecha la capacidad productiva de la máquina Bottle-pack ubicada en la Unidad Empresarial de Base (UEB) “Julio Trigo” de esta empresa, que se utiliza para el envasado y sellado de soluciones y suspensiones, lo que permite ampliar el surtido de productos para el consumo nacional y la exportación.<sup>(5)</sup>

Como parte de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) para el control de medicamentos, los fabricantes deben conseguir que sus productos sean seguros y eficaces. El cumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) permite la obtención de un producto con la calidad requerida. Todas las actividades analíticas realizadas en el laboratorio deben generar una serie de datos confiables durante el desarrollo del producto que avalen su calidad y estabilidad en las condiciones de almacenamiento recomendadas por el fabricante.<sup>(6)</sup>

El objetivo fundamental de la Empresa Laboratorios AICA+ 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 fue validar un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para evaluar el comportamiento analítico y la estabilidad de la gota ótica la de ciprofloxacino clorhidrato.<sup>(7)</sup>

## Métodos

Se utilizó un método por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa y se trabajó a una longitud de onda de 277 nm a un flujo de 2 mL/min y una mezcla

de solución A (ácido fosfórico 0.025 mol/L, que se ajustó con trietilamina a pH  $3 \pm 0,1$ ) y acetonitrilo como fase móvil.<sup>(8)</sup> Para demostrar la confiabilidad del método se realizó una validación exhaustiva donde se analizaron los parámetros especificidad, linealidad, precisión y exactitud.<sup>(9)</sup>

## Validación del método analítico

La validación fue realizada según la categoría I (USP-42)<sup>(7)</sup> y la Regulación 40-2014 del Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED) para la validación de métodos de análisis. Se evaluaron los siguientes parámetros:<sup>(10,11,12)</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.
- *Linealidad del sistema*: se prepararon soluciones de sustancia de referencia química del analito a cinco concentraciones crecientes de clorhidrato de ciprofloxacino: 80 %, 90 %, 100 %, 110 % y 120 % y se analizaron por triplicado. Se inyectaron en el cromatógrafo las soluciones preparadas y se registraron las señales a una  $\lambda = 277$  nm. Se determinó la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación, la prueba de significación estadística de significación de la pendiente  $S_b$  rel (%), los coeficiente de variación de los factores de respuesta y el ensayo de proporcionalidad.
- *Repetibilidad*: se realizaron cinco determinaciones independientes bajo las mismas condiciones (mismo analista, equipo y el mismo día) a tres niveles de concentración (80 %, 100 % y 120 %), se utilizaron muestras reales de gotas óticas de clorhidrato de ciprofloxacino. Además, se realizó la prueba de G de Cochran para evaluar la influencia del factor concentración.
- *Precisión intermedia*: se seleccionó del laboratorio dos analistas y se repitió el procedimiento en dos días diferentes utilizando una muestra real al 100 % de la concentración. Se aplicaron pruebas de significación para comparar las medias obtenidas al variar las fuentes: día y analista.
- *Exactitud*: para el ensayo de la exactitud se utilizaron cinco concentraciones, en el intervalo entre el 80 % y el 120 % del valor teórico

declarado para la concentración de clorhidrato de ciprofloxacino en la formulación se realizaron tres réplicas para cada nivel de concentración. Para evaluar el parámetro de exactitud se determinó el porcentaje de recuperación (R) en cada réplica y el valor promedio de R, así como el coeficiente de variación (CV). Además, se comparó la concentración añadida contra la concentración recuperada en cada nivel mediante la prueba de ANOVA y se evaluó la influencia del factor concentración en la respuesta obtenida mediante la prueba de G de Cochran, comparando la G experimental (G exp) y la G tabulada (G tab).

- *Especificidad*: para el estudio de especificidad se analizó la sustancia de referencia de un placebo, las muestras del producto terminado en forma de inyectable liofilizado y muestras sometidas a condiciones drásticas, como hidrólisis ácida (con ácido clorhídrico 0,1 N), hidrólisis básica (con hidróxido de sodio 0,1 N), oxidación (con peróxido de hidrógeno), termólisis y fotólisis.
- *Criterio de aceptación*: para su 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 0,9980 y el coeficiente de variación del factor de respuesta resultó igual al 2,2 %.

En el estudio de repetibilidad realizado, la media fue del 100,37 % y el coeficiente de variación fue del 0,26 %. Los resultados del estudio de precisión intermedia del método aparecen reportados en la tabla 1. Al realizar el procesamiento estadístico de la muestra en condiciones diferentes, los valores de probabilidad para cada una de las pruebas fueron superiores a 0,05, para un 95,0 % de confianza.

**Tabla 1 - Repetibilidad del método cromatográfico**

Concentración teórica (%)	Concentración obtenida (%)	Resultado (%)
Bajo (80,0 %)	80,66	– $\bar{x}$ = 80,43 CV = 0,25
	80,29	
	80,28	
Medio (100,0 %)	100,37	– $\bar{x}$ = 100,37 CV = 0,19
	100,15	
	100,61	
Alto (120,0 %)	120,26	– $\bar{x}$ = 120,57 CV = 0,25
	120,68	
	120,96	
Parámetro estadístico	$G_{exp} (0,05;3,5) = 0,44$ $G_{tab} (0,05;5,3) = 0,74$ CV total (%) = 0,26	

La tabla 2 muestra el estudio de la repetibilidad realizado a tres muestras del producto con diferentes concentraciones (80 %, 100 % y 120 %), por el mismo analista, el mismo día, a través de 3 réplicas.

**Tabla 2 - Resultados del estudio de precisión intermedia**

Día	Concentración (%)		
	Analista 1*	Analista 2*	Resultado**
I	100,37	99,82	$\bar{x}$ = 100,20 % CV = 0,27 %
	100,15	100,17	
	100,61	100,40	
	100,37	99,82	
	100,15	100,17	
II	100,82	100,37	$\bar{x}$ = 100,43 % CV = 0,23 %
	100,36	100,15	
	100,36	100,61	
	100,82	100,37	
	100,36	100,15	
Resultado	$\bar{x}$ = 100,44 % CV = 0,23 %	$\bar{x}$ = 100,20 % CV = 0,24 %	Criterio CV ≤ 2,0 %

\*p-valor = 0,0663, \*\*p-valor 0,0653.

En la tabla 3 se observan los resultados del estudio de exactitud. La recuperación media fue de un 100,16 % y los valores de t (1,15) y G (0,22) calculados fueron

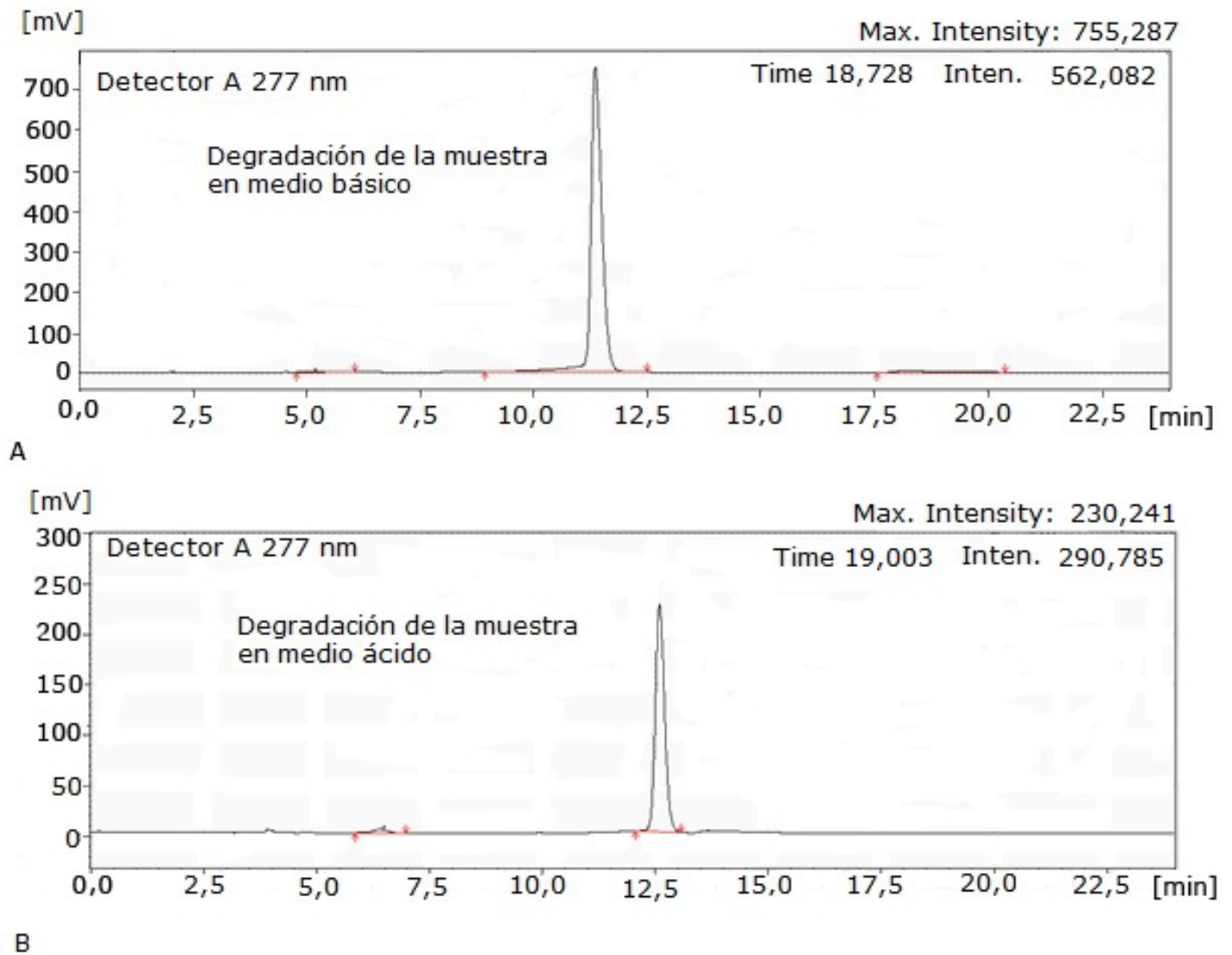
menores que los valores tabulados ( $t$  tabulada 1,77 y  $G$  tabulada 0,74), para un 95 % de confianza.

Tabla 3 - Exactitud del método cromatográfico

Cantidad adicionada (%)	Cantidad recuperada (%)	Recobrado (%)	Resultado (%)
80,0	80,71	100,89	Xm = 80,5 % CV = 0,37 %
	80,58	100,73	
	80,15	100,18	
90,0	90,47	100,52	Xm = 90,1 % CV = 0,31 %
	89,97	99,97	
	89,99	99,99	
100,0	99,99	99,99	Xm = 99,9 % CV = 0,28 %
	99,60	99,60	
	99,44	99,44	
110,0	110,62	100,56	Xm = 110,4 % CV = 0,21 %
	110,28	100,26	
	110,16	100,15	
120,0	120,23	100,20	Xm = 120,1 % CV = 0,17 %
	119,83	99,86	
	120,13	100,11	
Resultado	$G_{exp} = 0,22$ $t_{tab} = 0,74$	$\bar{x} = 100,16 \%$ CV tot = 0,39 % $t_{exp} 1,15 < t_{tab} 1,77$	

Coefficiente de variación total:  $CV_{total}$ ;  $G$  de Cochran experimental y tabulada:  $G_{exp}$  y  $G_{tab}$ ;  $t$  de Student experimental y tabulada:  $t_{exp}$  y  $t_{tab}$ .

En las figuras 1, 2 y 3 se muestran los resultados del estudio de especificidad del método. Se observa en los cromatogramas correspondientes a las muestras sometidas a condiciones drásticas de hidrólisis básica (C), hidrólisis ácida (D), la muestra sometida a la oxidación (E) y a altas temperaturas (F), la aparición de picos secundarios que son atribuibles a posibles productos de degradación, los cuales al compararlos con los cromatogramas con la señal obtenida para la sustancia de referencia química (A) y de la muestra de ciprofloxacino clorhidrato 0,2 % (B) no interfiere en la determinación del principio activo.



**Fig. 1** - Cromatogramas de: A) sustancia de referencia química, B) muestra de clorhidrato de ciprofloxacino 0,2 %.



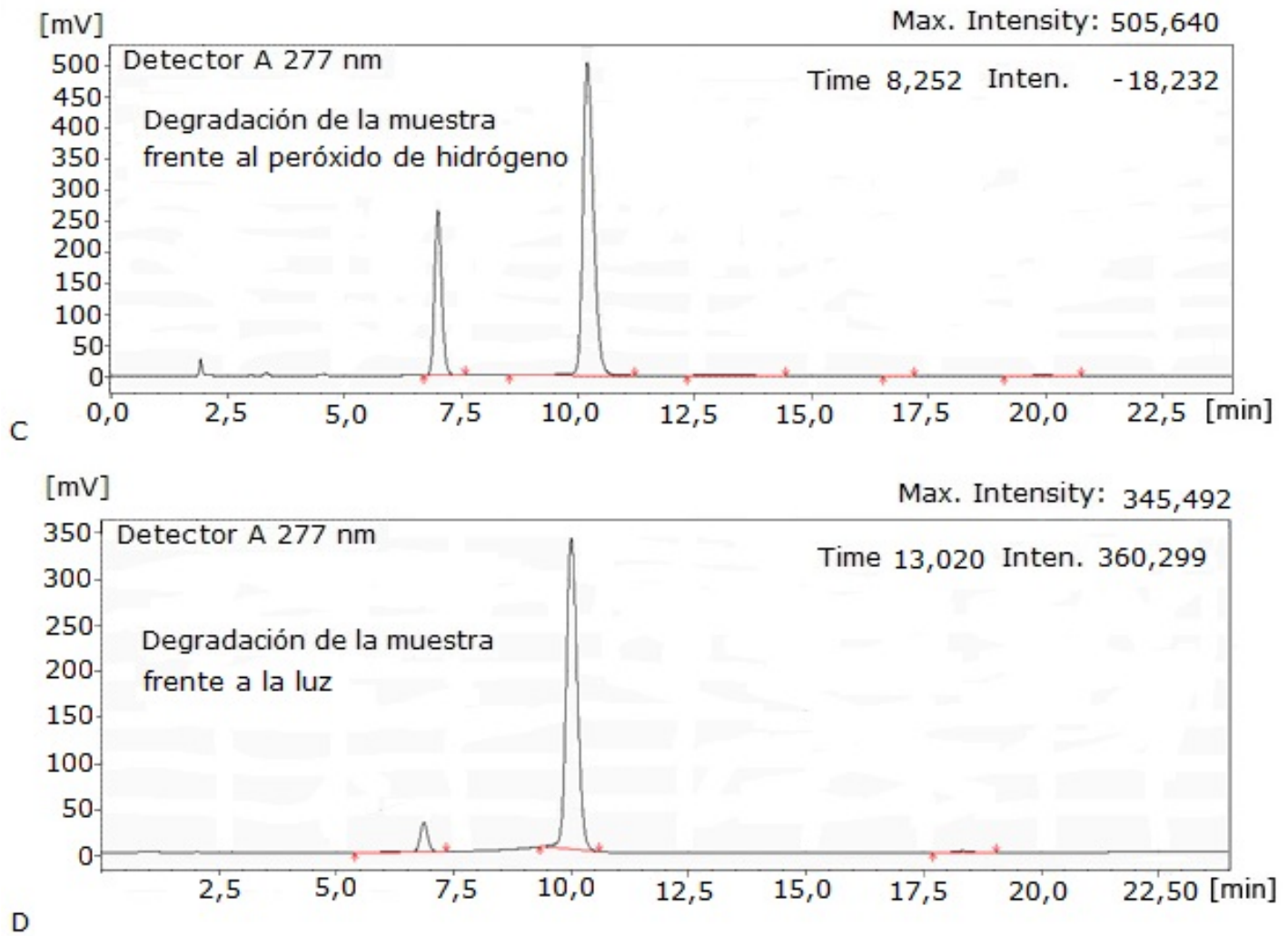


Fig.2 - Cromatogramas de: C) hidrólisis básica, D) hidrólisis ácida.

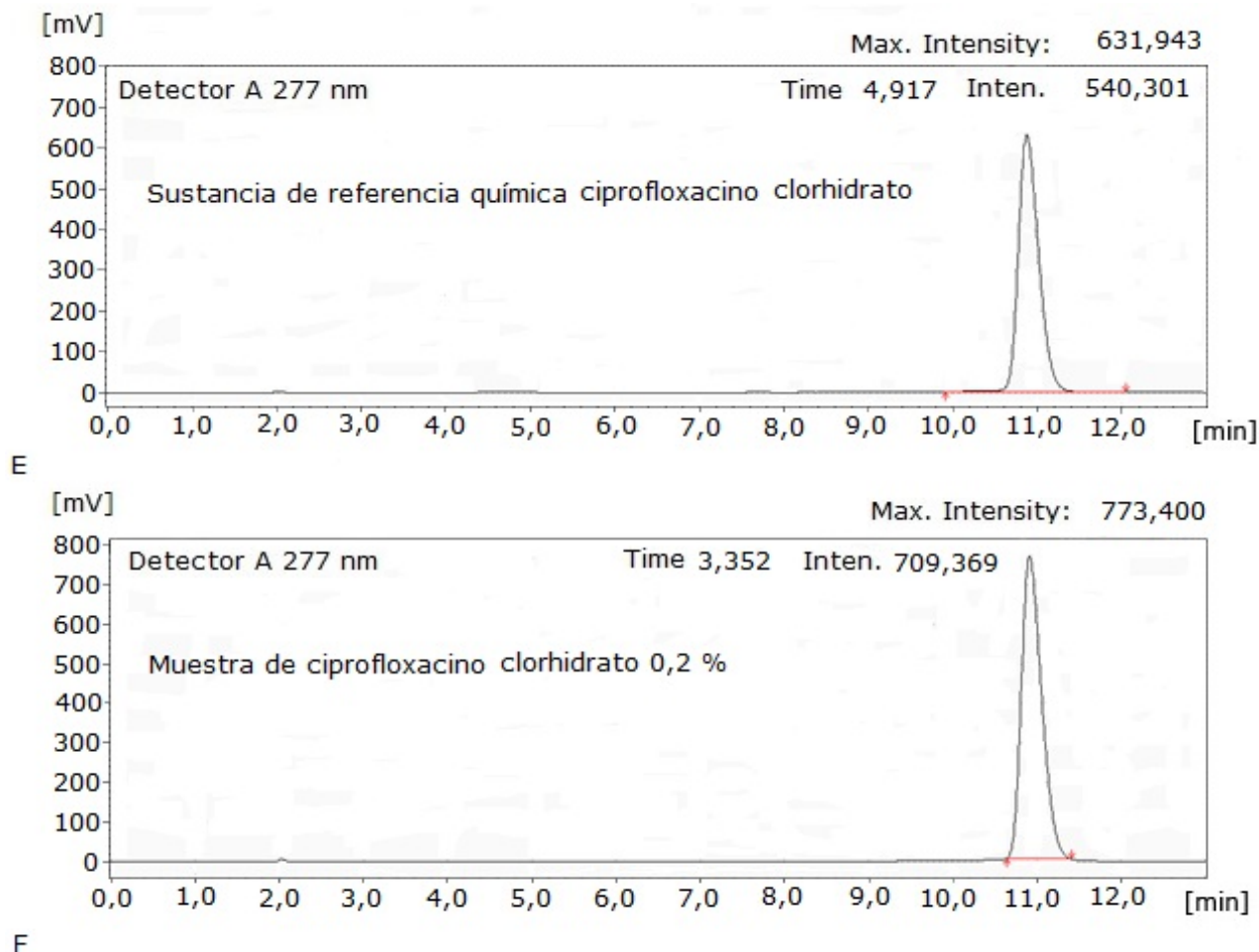


Fig.3 - Cromatogramas de: E) oxidación, F) termólisis.

## Discusión

En los resultados del estudio de linealidad se obtuvieron valores de coeficientes de regresión y de determinación (0,9980 y 0,9960, respectivamente), superiores a los establecidos en la Regulación 40 de 2014 del CECMED<sup>(10)</sup> (0,99 y 0,98, respectivamente). El valor del coeficiente de correlación 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. El coeficiente de variación de los factores de respuesta (2,2 %), también fue inferior al normado como máximo para estos indicadores (5 %), este factor se considera un estimador puntual que permite caracterizar la variabilidad.

El valor 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 muestran que se cumple con los test requeridos por lo que se manifiesta que hay linealidad y proporcionalidad en el rango de concentraciones escogidas.

En el estudio de la repetibilidad (Tabla 2) realizado a tres muestras del producto con diferentes concentraciones (80 %, 100 % y 120 %), por el mismo analista, el mismo día, a través de 3 réplicas, se alcanzaron coeficientes de variación adecuados (0,25 %; 0,19 % y 0,25 %, respectivamente), lo que demuestra la buena precisión del método. Se observa una variabilidad de los resultados dentro de los límites establecidos para los métodos cromatográficos ( $CV < 2,0$  %), 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.

Al realizar el procesamiento estadístico de la muestra en condiciones diferentes, los valores de probabilidad para cada una de las pruebas son superiores a 0,05, para un 95,0 % de confianza, lo que demuestra que no existen diferencias significativas al realizar la comparación del método entre días y entre analistas. Esto expresa que el método analizado es preciso en condiciones operativas diferentes.

Los porcentajes de recobrado están dentro de los límites establecidos para los métodos cromatográficos (98 % -102 %) y valores del coeficiente de variación menores que el 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 (0,22) menor que la G tabulada (0,74) con un 95 % de probabilidad, lo cual 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 0,28 %, se obtuvo una t calculada menor que la t tabulada. Los resultados demuestran la capacidad del método para dar resultados cercanos al valor verdadero, observándose una buena exactitud. Al ser el coeficiente de variación total (0,39) 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 que se obtuvieron en el estudio de especificidad del método permiten observar 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 considera 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 concluye que el presente método analítico validado por HPLC para la cuantificación del principio activo clorhidrato de ciprofloxacino 0,2 %, permite que por primera vez aparezca en el Cuadro Básico de medicamentos en Cuba (CMB) del Ministerio de Salud Pública (MINSAP) un medicamento por vía ótica. Lo anterior reafirma que uno de los renglones estratégicos de la Empresa Laboratorios AICA es la sustitución de importaciones, a partir de investigaciones para el desarrollo de nuevos medicamentos seguros y eficaces que cumplan con las Buenas Prácticas de Fabricación.

## Referencias bibliográficas

1. Cano I, Sáez O, García A. Otitis Externa. Guía ABE. Madrid: Grupo de Patología Infecciosa de AEPap (GPI-AEPAP); 2019 [acceso 22/07/2020]. Disponible en: <http://www.guía-abe.es>
2. Haddad J, Keesecker S. External otitis. Nelson Textbook of Pediatrics. Chap 639. 20 th ed., Elsevier editor. Philadelphia: PA; 2016 p. 12.
3. Luján Roca. Pseudomonas aeruginosa: un adversario peligroso. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 2014 [acceso 23/02/2019];48:465-74. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa>
4. Colectivo de autores. Cuadro Básico de Medicamentos. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2014. p. 103, 20-22 [acceso 24/01/2020]. Disponible en: <http://www.ecimed.sld.cu>
5. Colectivo de autores. Estudio de mercado para gotas nasales y gotas óticas. La Habana: Laboratorios Julio Trigo, AICA; 2014 p. 2, 16, 17-35.
6. CECMED. Regulación 16/2012. Directrices sobre Buenas Prácticas de Fabricación de Productos Farmacéuticos. La Habana: Centro Estatal para el Control de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos. (CECMED); 2012.
7. The United States Pharmacopeial Convention. Farmacopea de los Estados Unidos. 42 ed. Estados Unidos de América NF-37. Rockville: Mack Printing; 2019.

8. Quinteros JE, Obando LN. Validación de un método cromatográfico para cuantificación de Ciprofloxacina en tabletas [Tesis de diploma en Química Farmacéutica]: [Ecuador]. Universidad de Guayaquil; 2017 p. 10-17.
9. 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.
10. Colectivo de autores. Técnica de fabricante. Protocolo para la validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución para estudios de estabilidad en el producto óptico Ciprofloxacino 0,2 %. La Habana: Departamento de Investigaciones, AICA PMV-DG2-18-011; 2018.
11. Aksoy B, Küçükgülzel I, Rollas S. Development and Validation of a Stability-Indicating HPLC Method for Determination of Ciprofloxacin Hydrochloride and its Related Compounds in Film-Coated Tablets. *Cromatog.* 2007;66(S2):57-63. DOI: [10.1365/s10337-007-0287-6](https://doi.org/10.1365/s10337-007-0287-6)

### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

### Contribuciones de los autores

*Conceptualización:* Lilliam Besada Moreno, Carlos Rafael Romeu Carballo.

*Curación de datos:* Lilliam Besada Moreno.

*Análisis formal:* Lilliam Besada Moreno.

*Investigación:* Lilliam Besada Moreno, Gisela Ramírez Torres.

*Validación:* Lilliam Besada Moreno, Gisela Ramírez Torres.

*Visualización:* Lilliam Besada Moreno.

*Redacción-borrador original:* Lilliam Besada Moreno, Carlos Rafael Romeu Carballo.

*Redacción- revisión y edición:* Lilliam Besada Moreno, Carlos Rafael Romeu Carballo.

*Metodología:* Carlos Rafael Romeu Carballo, Gisela Ramírez Torres.

*Administración de proyecto:* Carlos Rafael Romeu Carballo.

*Supervisión:* Carlos Rafael Romeu Carballo.