

Desarrollo de un inyectable liofilizado de ácido zoledrónico 5 mg. Estudio de estabilidad

Yenilen Troche-Concepción^{1a*}, Nancy Burguet-Lago^{1b}, Alen Nils Baeza-Fonte^{2c*},
Griset Toledo-Carrabeo^{1d}, Mirna Fernández-Cervera^{3c}, YunetMirka Herrera-Espino^{4f}

¹ Empresa Laboratorios AICA, Unidad de Desarrollo e Innovación, Departamento de I+D, Ave 39 A N.º 4602 e/ 46 y 48, Playa, La Habana, Cuba, CP 11300.

² Laboratorio Universitario para la Caracterización de la Estructura de la Sustancia, Instituto de Ciencia y Tecnología de Materiales, Universidad de la Habana, Calle Zapata y G, sin Número, Municipio Plaza, La Habana, Cuba, CP 10400.

³ Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana, Departamento de Farmacia, Calle 222 entre 23 y 29 No. 2317, La Coronela, La Lisa, La Habana, Cuba, CP 13600.

⁴ Empresa Laboratorios MedSol, Unidad Empresarial de Base Reinaldo Gutiérrez Planta Hanco-Reyval, Departamento Técnico Productivo, Avenida independencia e/ A y Norte N.º 10132, Residencial Almendares, La Habana, Cuba, CP 10800.

Correos electrónicos:

^ayenilent@aica.cu

^bnburguet@aica.cu

^calen@imre.uh.cu

^dgrisetca@aica.cu

^emirnafc@ifal.uh.cu

^fyunet@rg.medsol.cu

* Autores para correspondencia

Recibido: 4 de junio de 2021

Revisado: 2 de octubre de 2021

Aceptado: 9 de octubre de 2021

RESUMEN

Introducción: el ácido zoledrónico es un inhibidor de la resorción ósea que se utiliza en el tratamiento de la enfermedad de Paget, la prevención de la osteoporosis inducida por glucocorticoides y la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas y hombres.

Objetivo: evaluar la estabilidad de un nuevo inyectable liofilizado de ácido zoledrónico 5 mg a través de los parámetros de calidad. **Métodos:** se validó un método de HPLC con detector UV para determinar la estabilidad química de la formulación a través de la presencia de productos de degradación y la concentración del ácido zoledrónico en el producto terminado. También se midieron las características organolépticas, pH, esterilidad y endotoxinas bacterianas, partículas en inyectables y totalidad y transparencia de soluciones de este. **Resultados:** el método cromatográfico resultó satisfactorio para su empleo en la evaluación del producto terminado. Se elaboraron 3 lotes del inyectable de ácido zoledrónico 5 mg liofilizado, los cuales cumplieron con los límites de calidad establecidos durante los 6 meses (estabilidad acelerada) y hasta los 24 meses (vida útil).

Palabras clave: Ácido zoledrónico, atributos de calidad, validación, estabilidad.

SUMMARY

Development of a lyophilized injectable of zoledronic acid 5 mg. Stability study

Introduction: Zoledronic acid is an inhibitor of bone resorption used in the treatment of Paget's disease, the prevention of glucocorticoid-induced osteoporosis, osteoporosis in postmenopausal women and in men. **Aim:** To evaluate the stability of a new lyophilized injection of zoledronic acid 5 mg through the quality parameters. **Methods:** An HPLC method with UV detector was validated for the finished product and the chemical stability of the formulation was determined through the presence of degradation products and the concentration of zoledronic acid in the finished product. In addition, the organoleptic characteristics, pH, sterility and bacterial endotoxins, particles in injectables and totality and transparency of solutions were measured. **Results:** The chromatographic method was satisfactory for its use in the evaluation of the finished product. 3 batches of the lyophilized 5 mg zoledronic acid injection were made which met the quality limits established during 6 months (accelerated stability) and up to 24 months (shelf life).

Keywords: Zoledronic acid, quality attributes, validation, stability.

RESUMO

Desenvolvimento de um injetável liofilizado de ácido zoledrónico de 5 mg. Estudo de estabilidade

Introdução: o ácido zoledrónico é um inibidor da reabsorção óssea utilizado no tratamento da doença de Paget, na prevenção da osteoporose induzida por glicocorticóides e na osteoporose em mulheres e homens na pós-menopausa. **Objetivo:** avaliar a estabilidade de um novo injetável liofilizado de ácido zoledrónico 5 mg por meio de parâmetros de qualidade. **Métodos:** um método de HPLC com detector UV foi validado para determinar a estabilidade química da formulação através da presença de produtos de degradação e da concentração de ácido zoledrónico no produto acabado. Também foram medidas as características organolépticas, pH, esterilidade e endotoxinas bacterianas, partículas em injetáveis e totalidade e transparência de suas soluções. **Resultados:** o método cromatográfico foi satisfatório para sua utilização na avaliação do produto acabado. Foram produzidos três lotes de injeção de ácido zoledrónico liofilizado de 5 mg, que atenderam aos limites de qualidade estabelecidos para 6 meses (estabilidade acelerada) e até 24 meses (prazo de validade).

Palavras-chave: Ácido zoledrónico, atributos de qualidade, validação, estabilidade.

INTRODUCCIÓN

El zoledronato, un aminobisfosfonato, es un potente inhibidor de la resorción ósea [1-5]. Se utiliza para el tratamiento de la enfermedad ósea de Paget, prevención de la osteoporosis inducida por glucocorticoides y para tratar la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas y en hombres [2, 6]. El ácido zoledrónico se administra en forma de infusión intravenosa única de 5 mg para tratar la enfermedad ósea de Paget [2, 7]. Para la osteoporosis posmenopáusica, la osteoporosis masculina y la osteoporosis inducida por glucocorticoides [8], la dosis recomendada es una infusión intravenosa única de 5 mg de ácido zoledrónico administrada una vez al año [2, 9, 10].

Las preparaciones de ácido zoledrónico se han estudiado por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) con detección ultravioleta (215-220 nm), usando tampón fosfato y pareamiento iónico con sales de tetrabutilamonio [1, 6, 11-13], ambos en mezclas con metanol en columnas de fase reversa (C8 y C18) y temperaturas que rondan los 50 °C. Estas metodologías se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Metodologías descritas para la cuantificación del ácido zoledrónico.

Muestra	FM ^a	λ (nm)	Flujo (mL/min)	Temperatura (°C)	Columna	Ref. ^b
Tabletas	K ₂ HPO ₄ + hidrógenosulfato de TBA ^c /metanol (900:100 v/v)	215	0,8	50	ODS	[1]
Inyectable (solución)	K ₂ HPO ₄ + hidrógenosulfato de TBA/metanol (900:100 v/v)	215	1,0	50	C18	[6]
IFA ^d e inyectable (solución)	K ₂ HPO ₄ + hidrógenosulfato de TBA/metanol (900:100 v/v) pH 7,2	215	0,8	50 ± 5	C18	[11]
IFA e inyectable (liofilizado)	Metanol/NaH ₂ PO ₄ (5 mM) pH 7 + bromuro de TBA (20:80 v/v)	220	1,0	ambiente	C8	[12]
IFA e inyectable (solución)	Metanol/acetronitrilo/ KH ₂ PO ₄ (0,02 M) pH 5,5 (25:5:70 v/v)	220	1,2	ambiente	RP18	[13]

^aFM: fase móvil, ^bRef.: referencia, ^cTBA: tetrabutilamonio, ^dIFA: ingrediente farmacéutico activo (ácido zoledrónico).

Los métodos de análisis se deben validar previos a su uso [14, 15]. Uno de los parámetros, la especificidad, asegura la no interferencia del analito con impurezas, productos de degradación y excipientes, entre otros [14]. Con respecto al ácido zoledrónico se refieren como sustancias relacionadas probables en el producto terminado, compuesto relacionado A de ácido zoledrónico [ácido (imidazol-1-YL) acético] e imidazol [11, 12].

El presente estudio tiene como objetivo evaluar la estabilidad acelerada y de vida de estante de una nueva formulación inyectable y liofilizada de ácido zoledrónico 5 mg.

METODOLOGÍA

Reactivos y materias primas

Fueron utilizados el hidrógenosulfato de tetrabutilamonio (C₁₆H₃₇NO₄S, IPC), dihidrógenofosfato de potasio (KH₂PO₄), hidróxido de sodio (lentejas), ácido clorhídrico

(HCl) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , 30%); de calidad PA y procedentes de Alemania. El estándar de referencia secundario de ácido zoledrónico fue suministrado por el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM, Cuba). El ácido zoledrónico monohidratado como ingrediente farmacéutico activo (IFA) fue suministrado por Shan Dong Boyuan Chemical Co. LTD, mientras el manitol se obtuvo de Qingdao Bright Moon, ambos de China. El trisodio citrato dihidratado se adquirió de Panreac (España) y las sustancias relacionadas: imidazol y compuesto relacionado A de ácido zoledrónico fueron estándares de referencia USP (EE.UU.).

Elaboración del inyectable liofilizado

El inyectable de ácido zoledrónico (5 mg) estaba compuesto por manitol (sustancia de soporte), trisodio citrato (regulador de pH) y agua para inyección (vehículo). Como material de envase fueron empleados viales transparentes 6 R, calidad hidrolítica I, de 10 mL de capacidad con tapón de bromobutilo de 20 mm de diámetro y sello de aluminio anodizado.

La liofilizadora industrial utilizada fue LYOMEGA 80ST TELSTAR (España), con capacidad de evacuación de 75 kg de hielo. Los lotes pilotos fueron identificados como ZO13001, ZO13002 y ZO13003 para un total de 7484 viales.

Durante los procesos de liofilización se midió y registró de forma continua la temperatura del producto, las platinas, el condensador y la presión de la cámara. Los ciclos se consideraron concluidos cuando las temperaturas del producto y las platinas se mantuvieron iguales al menos 4 h. Se realizó también la prueba de presión de la cámara aislada considerándose satisfactoria una variación menor de 0,05 mbar [16].

Evaluación de la formulación

Características organolépticas

Se comprobó a través de la inspección visual que 10 viales/lote de inyectable, se correspondieran a un bulbo transparente con un polvo liofilizado de color blanco, libre de cuerpos extraños.

pH

Para la medición se utilizó un pH-metro Orion 420 Aplus (EE.UU.). Se tomaron 10 viales liofilizados y se les inyectaron 5,0 mL de agua destilada a cada uno, agitando hasta disolver todo el contenido. La solución se vertió en un vaso de precipitado de 100 mL. La determinación se realizó por triplicado aceptando valores entre 5,9 y 7,0 [3,10].

Determinación de agua

Se realizó con el empleo del equipo Karl Fischer (Mettler Toledo V20, Suiza), según el procedimiento descrito en la USP 40 [15]. Los viales con las muestras se pesaron de forma individual. En la determinación se adicionaron 3,0 mL de metanol (Merck, Alemania) en cada bulbo independiente para dispersar la muestra y fue empleado como blanco la misma cantidad de metanol (n=3). Por otra parte, los bulbos se lavaron con agua destilada, hasta quedar limpios y fueron secados a 120 °C por 2 h en estufa lo cual permitió establecer la masa de producto extraída en cada análisis. Estos últimos se colocaron en desecadora hasta que alcanzaron la temperatura ambiente. Valores de humedad residual inferiores a 5% [16] fueron considerados adecuados.

Ensayos de esterilidad y endotoxinas bacterianas

Los procedimientos se realizaron según la USP 40 [15]. Para la determinación de endotoxinas bacterianas se aplicó el ensayo del lisado de amebocitos del *Limulus* (LAL), con el empleo de la técnica cromogénico-cinética. Al no estar reportada la monografía para este producto en la USP 40, el valor límite fue calculado a partir del cociente K/M, K fue la dosis pirogénica umbral por kg de peso corporal y M, la dosis máxima recomendada del producto (en bolo, 5 mg) por kg de peso corporal (adulto promedio, 70 kg). El valor obtenido del límite máximo, para este caso fue de 70,4 UE/mL.

Totalidad y transparencia de soluciones [15]

A cinco viales de producto liofilizado de cada lote (n=3) se les inyectaron 5 mL de agua destilada y fueron agitados hasta disolución total. Se verificó que la solución reconstituida no fuera significativamente menos transparente que un volumen igual de agua purificada exenta de partículas en un recipiente similar y que se pudieran observar durante la inspección visual.

Partículas en inyectables [15]

Se empleó el método de obstrucción de luz, en el que se utilizaron 10 bulbos/lote, reconstituidos con agua exenta de partículas, para obtener una solución con un volumen mayor de 25 mL. Las muestras se colocaron en el contador de partículas subvisibles (Ryon, EE.UU.) y se comprobó que el número de partículas $\geq 10 \mu\text{m}$ fuera ≤ 6000 ; y para partículas $\geq 25 \mu\text{m}$ ≤ 600 .

Productos de degradación

El desarrollo del estudio correspondiente se llevó a cabo por CLAR (Shimadzu Prominence, Japón) con una bomba (LC-20AT), detector UV de arreglo de diodos

(SPD-M20A), un inyector automático (SIL-20A), además de desgasificador y horno. El *software* LCSolution 1.24 (Shimadzu, Japón) permitió analizar los resultados cromatográficos. También fueron utilizados una estufa (Boxum BGZ series III, China) y un baño termostático (Ultrasoniccleaner SB-3200DT, China). Como fase móvil fue empleada una mezcla de 5 mM de dihidrógenofosfato de potasio y 10 mM de hidrógenosulfato de tetrabutilamonio disueltos en agua destilada. El volumen de inyección fue de 20 μ L, con 1,0 mL/min de flujo, midiendo a 215 nm en una columna C8 (Grace, Apollo, 250 L x 4,6 mm DI, 5 μ m, EE.UU.) [17].

Valoración de IFA e impurezas en producto terminado

Se empleó un cromatógrafo (Knauer, Alemania), con bomba de gradiente de baja presión 1000, inyector manual Rheodyne 7725i, detector UV-visible S2600, controlado mediante el *software* ClarityChrom versión 6.1.0.130, con las condiciones y columna establecidas en el estudio de productos de degradación. Durante la estabilidad se consideraron los límites especificados a continuación para el IFA y sus sustancias relacionadas. Tomando en consideración que el rango de uso de ácido zoledrónico es de 2 a 10 mg/dosis y que las más empleadas son las de 4 y 5 mg [18], se estableció un intervalo de \pm 10% de la dosis para la valoración. Los criterios seleccionados en cada caso fueron:

- Contenido de ácido zoledrónico, en el inyectable liofilizado: 90-110%.
- Imidazol: no más de 0,15%, del IFA.
- Compuesto relacionado A de ácido zoledrónico: no más de 0,15% del IFA.
- Cualquier impureza inespecífica: no más de 0,10% del IFA.
- Total de impurezas: no más de 0,50% del IFA.

Validación del método cromatográfico para cuantificar el IFA en el producto terminado

Para validar este método se tuvo en cuenta que el contenido de un bulbo de ácido zoledrónico debe estar entre 4,5-5,5 mg, equivalente a 90,0-110,0% de la dosis establecida (5 mg). Los parámetros evaluados fueron: especificidad, linealidad, exactitud y precisión, según la categoría de análisis [14,15]. Los datos se analizaron con el programa Statgraphics Plus 5.0 (EE.UU.). En los ensayos descritos se empleó un volumen de inyección de 20 μ L.

Especificidad

Se analizó el producto terminado, la mezcla de patrón de analito con imidazol, compuesto relacionado A de ácido zoledrónico y citrato trisódico; y el producto terminado

degradado bajo diferentes condiciones de estrés [14, 15]. La degradación artificial de las muestras (un bulbo equivalente a 5 mg de IFA) se efectuó durante 4 h (80 °C) con adición de 2 mL/bulbo de agua, NaOH 1 N, HCl 1 N y 10 gotas de H₂O₂ (30%) por separado. La fotodegradación se realizó por exposición a la luz solar directa durante siete días, mientras la termólisis se llevó a cabo a 80 °C durante 4 h en estufa, ambos ensayos realizados con bulbos de producto terminado liofilizado. Antes de analizar las soluciones resultantes de las hidrólisis básica y ácida, estas fueron neutralizadas. Todas las soluciones fueron llevadas a un volumen final de 50 mL completando con fase móvil y luego inyectadas en el equipo (20 µL). Todos los ensayos, con excepción de la fotodegradación, fueron realizados en la oscuridad para evitar combinación de efectos.

Linealidad

La linealidad del método se analizó entre 50 y 150% a 5 niveles de concentración por triplicado. Las soluciones de cada nivel de concentración fueron preparadas disolviendo la cantidad adecuada del patrón ácido zoledrónico en 4 mL de NaOH 0,1 N y enrasando a 50 mL con la fase móvil para obtener concentraciones entre 0,20 mg/mL (50%)-0,60 mg/mL (150%). En la evaluación de la linealidad fueron estimados el factor de correlación (r), el intercepto y su significación, la pendiente de la recta y el coeficiente de variación de los factores respuesta.

Exactitud

Al placebo se le adicionaron cantidades conocidas de ácido zoledrónico monohidratado, por triplicado, equivalentes a las concentraciones de 0,3; 0,4 y 0,5 mg/mL (equivalentes a 75-125%). Se determinó el porcentaje de recuperación, el coeficiente de variación total (CV), realizándose la comparación con los valores añadidos (t -Student) y de dispersión entre los respectivos niveles de recobrados (C -Cochran).

Repetibilidad

Las determinaciones fueron hechas por el mismo analista en las mismas condiciones de trabajo. Se estudió la concentración del 100% en 10 determinaciones de una muestra homogénea y se calcularon los valores de la media y CV.

Precisión intermedia

El estudio se realizó en dos días, por dos analistas diferentes, en el mismo laboratorio. Se prepararon por triplicado las muestras de producto terminado liofilizado correspon-

dientes a las concentraciones 75% (3 bulbos), 100% (4 bulbos) y 125% (5 bulbos) de la concentración teórica (5 mg) disolviendo con 2 mL de NaOH 0,1 N y diluyendo en 50 mL de fase móvil. Se determinaron la media y CV_{total} , comparando además los resultados entre analistas y entre días, para un nivel de confianza del 95% para las medias (t-Student) y para las varianzas entre ellos (F-Fisher).

Estudios de estabilidad del producto terminado

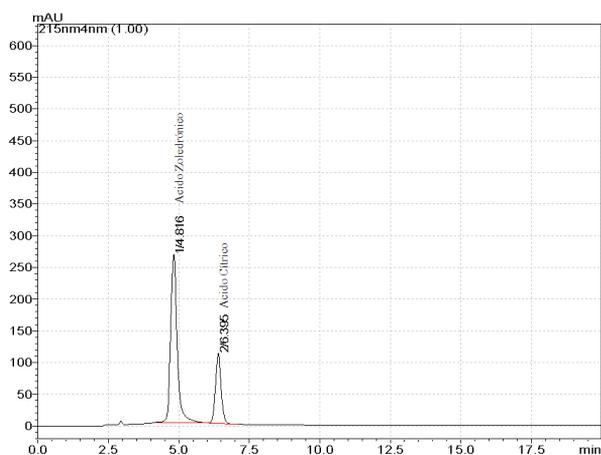
Para el estudio de estabilidad en vida estante durante 24 meses se almacenaron las muestras de 3 lotes a una temperatura de 30 ± 2 °C y $70 \pm 5\%$ de humedad relativa, mientras que para la estabilidad acelerada se colocaron en la cámara Lunaire Environmental (CEO910-4, EE.UU.) durante 6 meses a una temperatura de 40 ± 2 °C y $75 \pm 5\%$ de humedad relativa [19].

La frecuencia de análisis (estudio acelerado: 0, 1, 2, 3 y 6 meses; vida de estante: 0, 3, 6, 9, 12, 18 y 24 meses) y los parámetros a evaluar correspondieron a lo descrito en la regulación de estabilidad del Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos de Cuba [19], a saber, las características organolépticas, valoración, pH, totalidad y transparencia de soluciones para todos los tiempos de ensayo. La determinación de agua se realizó al inicio, a los 6 meses (acelerado y vida estante), 12 y 24 meses. La esterilidad, las endotoxinas bacterianas y las partículas en inyectables fueron evaluadas al inicio, 6 meses (estudio acelerado), además de 12 y 24 meses en vida estante.

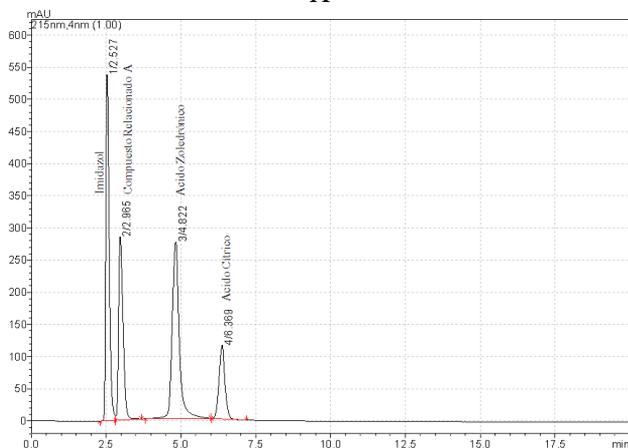
Con el método CLAR se cuantificaron los productos de degradación, en los intervalos de tiempos correspondientes para los estudios de estabilidad acelerada y de vida de estante. En el ensayo se empleó una mezcla de imidazol y del compuesto relacionado A de ácido zoledrónico (mezcla 1), ambos a una concentración de $0,6 \mu\text{g/mL}$ ($0,15\%$ de la concentración de ácido zoledrónico de $0,4 \text{ mg/mL}$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra los cromatogramas característicos del producto terminado y de la separación del ácido zoledrónico con respecto a sus productos de degradación: imidazol, compuesto relacionado A y de la señal del excipiente ácido cítrico.



A



B

Figura 1. A: cromatograma correspondiente a producto terminado. B: mezcla de producto terminado con los productos de degradación del IFA. Las concentraciones empleadas en la obtención del cromatograma fueron: imidazol (0,08 mg/mL), compuesto relacionado A (0,08 mg/mL) ácido zoledrónico (0,4 mg/mL) y citrato de sodio (1,68 mg/mL). El volumen de inyección utilizado en la obtención de ambos cromatogramas fue 20 μ L.

La figura 2 muestra los cromatogramas de los diferentes tratamientos de degradación forzada sobre el producto terminado en el estudio de especificidad.

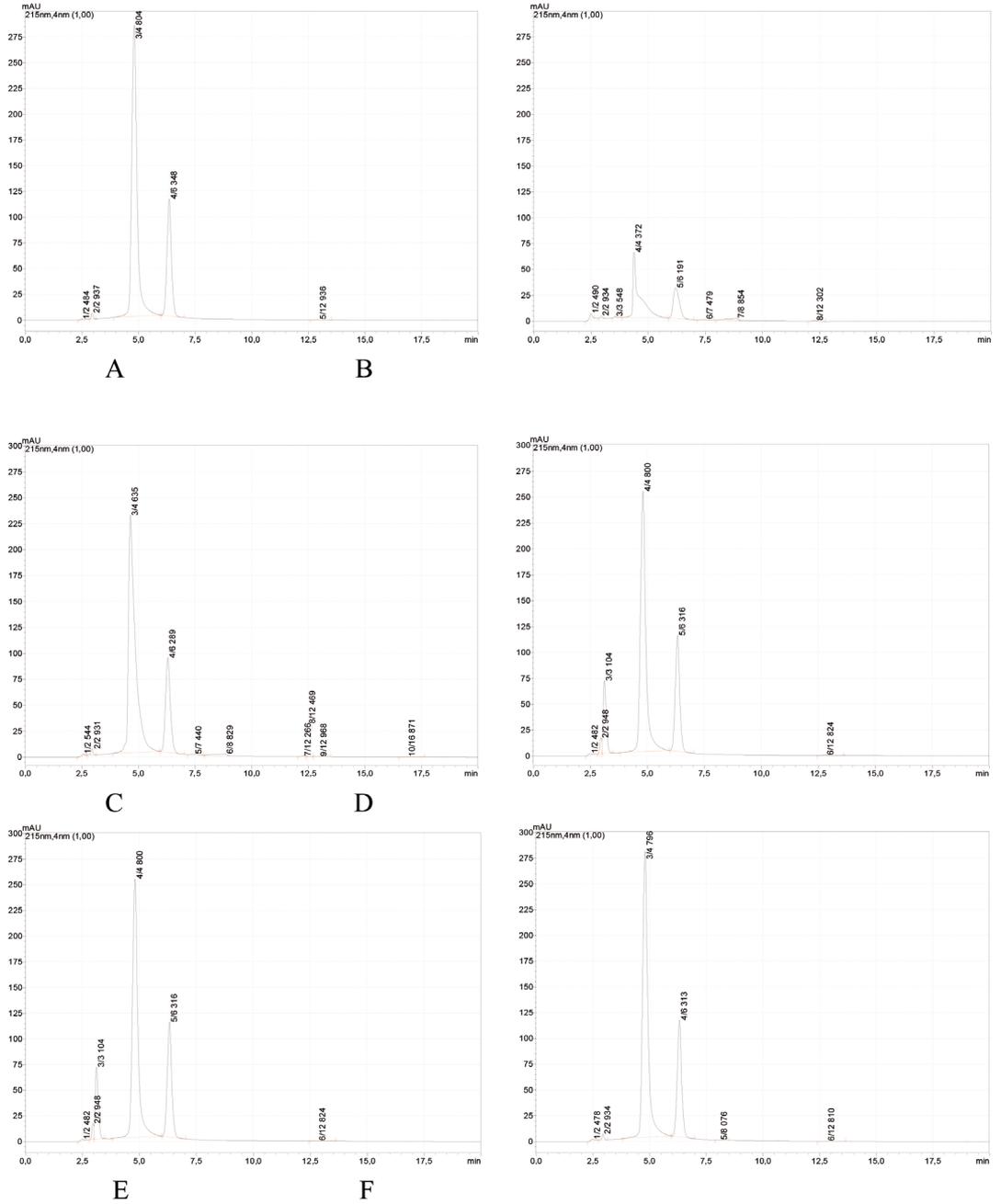


Figura 2. Cromatogramas correspondientes a los tratamientos. A: hidrólisis acuosa, B: hidrólisis básica, C: hidrólisis ácida, D: termodegradación, E: oxidación, y F: fotodegradación.

En la tabla 2 se resumen los resultados de la exactitud y precisión intermedia.

Tabla 2. Resultados de los ensayos de exactitud y precisión intermedia.

Exactitud					
Nivel (%)	AZ ^a (%)	Estadígrafos	(P-valor)		
75	99,8	t_{exp} (75 %)	-0,67		
100	100,6	t_{exp} (100 %)	1,21		
125	99,1	t_{exp} (125 %)	-1,93		
CV total Recuperación (%)	0,75	C_{tab} (Cochran)	0,87		
		C_{exp} (Cochran)	0,42		
		t_{tab}	2,31		
Precisión					
Nivel (%)	t_{exp} (día)	t_{exp} (analista)	t_{tab}	CV global (%)	
75	0,34	-2,20	2,571	0,31	
100	-0,42	1,87		0,53	
125 %	2,11	-1,56		0,30	
Nivel (%)	F_{exp} (día)	F_{exp} (analista)	F_{tab}	Límites	
75	1,30	0,45	5,05	CV ≤ 2 %	
100	3,55	0,21		$F_{exp} \leq F_{tab}$	
125	3,56	4,90		$t_{exp} \leq t_{tab}$	

^aAZ: concentración de ácido zoledrónico

Los resultados satisfactorios en los lotes pilotos liofilizados de la formulación recién elaborada sugieren la consistencia del proceso tecnológico desarrollado. Los resultados del estudio de estabilidad se resumen en las tablas 3 y 4 (acelerado y vida estante, respectivamente). Todos los parámetros cumplieron con los criterios de aceptación establecidos, manteniéndose la apariencia del producto liofilizado, pH, contenido de fármaco, contenido de humedad y calidad microbiológica reflejada en los resultados de endotoxinas bacterianas y la esterilidad.

Tabla 3. Resultados del estudio acelerado de los lotes de estudio.

Ensayos	Tiempo (mes)	Lotes		
		ZO13001	ZO13002	ZO13003
pH	Inicial	6,3	6,3	6,3
	1	6,4	6,4	6,4

(Continúa)

Ensayos	Tiempo (mes)	Lotes		
		ZO13001	ZO13002	ZO13003
	2	6,4	6,4	6,4
	3	6,4	6,4	6,4
	6	6,4	6,4	6,4
Valoración (%)	Inicial	103,1	103,3	103,2
	1	99,1	100,0	100,2
	2	100,3	100,9	99,0
	3	98,2	98,6	98,2
	6	101,7	100,3	101,4
Determinación de agua (%)	Inicial	1,1	0,8	0,8
	6	0,7	0,5	0,6
Endotoxinas bacterianas (EU/mL)	Inicial	1,94	0,5	0,5
	6	0,05	0,05	0,05
Partículas en inyectables	Inicial	≥ 10 µm: 671 ≥ 25 µm: 3	≥ 10 µm: 516 ≥ 25 µm: 1	≥ 10 µm: 398 ≥ 25 µm: 13
	6	≥ 10 µm: 534 ≥ 25 µm: 5	≥ 10 µm: 453 ≥ 25 µm: 2	≥ 10 µm: 258 ≥ 25 µm: 4

Tabla 4. Resultados del estudio de estabilidad vida estante.

Ensayos	Tiempo (mes)	Lotes		
		ZO13001	ZO13002	ZO13003
pH	Inicial	6,3	6,3	6,3
	3	6,4	6,4	6,4
	6	6,4	6,5	6,4
	9	6,4	6,4	6,4
	12	6,4	6,4	6,4
	18	6,4	6,4	6,4
	24	6,5	6,5	6,5
Valoración (%)	Inicial	103,1	103,3	103,2
	3	100,2	101,2	101,0
	6	100,8	100,8	100,3
	9	101,7	102,1	101,8
	12	101,5	96,9	98,7

(Continúa)

Ensayos	Tiempo (mes)	Lotes		
		ZO13001	ZO13002	ZO13003
	18	96,9	98,6	98,2
	24	98,5	99,8	98,0
Determinación de agua (%)	Inicial	1,1	0,8	0,8
	6	1,0	0,7	0,9
	12	1,4	1,2	1,2
	24	0,9	1,0	1,8
Endotoxinas bacterianas (EU/mL)	Inicial	1,94	0,5	0,5
	12	50,0	5,0	5,0
	24	5,0	5,0	5,0
Partículas en inyectables	Inicial	≥ 10 µm: 671 ≥ 25 µm: 3	≥ 10 µm: 516 ≥ 25 µm: 1	≥ 10 µm: 398 ≥ 25 µm: 13
	12	≥ 10 µm: 519 ≥ 25 µm: 4	≥ 10 µm: 402 ≥ 25 µm: 2	≥ 10 µm: 358 ≥ 25 µm: 5
	24	≥ 10 µm: 136 ≥ 25 µm: 3	≥ 10 µm: 120 ≥ 25 µm: 1	≥ 10 µm: 50 ≥ 25 µm: 2

La especificidad a los productos de degradación se logró mediante un mecanismo de distribución. El uso de un reactivo de pareamiento iónico (tetrabutilamonio en forma de hidrógeno sulfato) fue completamente necesario, al anular las cargas negativas del ácido zoledrónico (valores de $pK_a = 0,66$ [20] - {2,89-6,63-10,99} [21]) ionizado al pH de trabajo (2,3). Este par iónico permitió obtener temporalmente una especie más hidrófoba que el analito, haciendo posible su retención bajo estas condiciones. El uso de modificadores orgánicos (solventes) durante la cromatografía no fue necesario pues la elución ocurrió en un tiempo inferior a 20 min sin distorsión de los picos, ni retención excesiva de productos de degradación. La columna seleccionada (C8) permitió mantener la resolución adecuada (1,748-5,505) entre el ácido zoledrónico, sus productos de degradación (imidazol y compuesto relacionado A) y tri-sodio citrato. La retención de este último, en forma de ácido cítrico, también observable, fue posible a partir de la supresión iónica que sufre al encontrarse el pH de la fase móvil por debajo de su menor valor de pK_a ($pK_{a1}=3,14$; $pK_{a2}=4,77$; $pK_{a3}=6,39$) [22]. En las condiciones del método se obtuvieron valores de asimetría entre 1,020-1,614 para los cuatro picos observables (figura 1). Estos valores fueron adecuados para la cuantificación del ácido zoledrónico y de sus productos de degradación en el producto terminado.

En los cromatogramas obtenidos (figura 2) se distinguen los productos de degradación que aparecen después de los tratamientos aplicados y la no interferencia en la determinación del IFA, manteniéndose una pureza de pico para el ácido zoledrónico $\geq 99,0\%$

en todos los casos. No se observó ninguna señal, como resultado de las degradaciones, por encima de los 20 min de corrida.

La hidrólisis básica provocó una disminución en 73,3% y una distorsión del pico perteneciente al ácido zoledrónico, por lo que no se descartó la presencia de productos de degradación no absorbentes a esta longitud de onda y, por tanto, no detectables en este sistema cromatográfico. De los tratamientos realizados, este resultó ser el de mayor impacto en la muestra.

Una degradación menos importante se produjo con la oxidación mediante H_2O_2 (7,4%), observable en el incremento de una señal asignable al compuesto relacionado A. La variación de la señal del IFA para el resto de los tratamientos fue la siguiente: hidrólisis acuosa (1,6%), hidrólisis ácida (2,7%), degradación térmica (2,5%) y degradación por exposición a la luz (0,8%). Con esto se concluyó que el método resultó específico para evaluar el ácido zoledrónico en presencia de sus productos de degradación principales y de otras sustancias provenientes de la exposición de la formulación a condiciones adversas.

En la linealidad se obtuvo $r = 0,9999$. La pendiente de este análisis fue significativa ($t_{exp} = 249,1$; $> t_{tab} = 2,145$), con lo cual el procedimiento es adecuado para medir pequeños cambios en la concentración del IFA mientras que el intercepto resultó no significativo ($t_{exp} = 1,667 < t_{tab} = 2,145$). El CV (factores respuesta) fue de 0,48% ($\leq 5\%$) indicando una baja dispersión de los datos.

En el ensayo de exactitud (tabla 2), la recuperación (75-125%) estuvo entre 99,1% y 100,6% ($CV_{global} \leq 0,75\%$), sin presentar diferencias significativas entre lo añadido y lo recuperado para cada nivel de concentración y entre todos ellos ($C_{exp} = 0,42$).

Los resultados de la repetibilidad mostraron un CV de 0,37% ($\leq 2\%$) y en la precisión intermedia (tabla 2) los $CV_{totales}$ se encontraron entre 0,30-0,53%. Para esta última, al comparar los resultados entre días, analistas y niveles de concentración fueron obtenidos valores de $t_{exp} < t_{tab}$; por tanto, el método resultó preciso.

Durante el estudio acelerado (tabla 3), los atributos de calidad correspondientes como las características organolépticas del producto, totalidad y transparencia de soluciones y esterilidad cumplieron con los límites establecidos. Respecto a la estabilidad en condiciones de estante (tabla 4), hasta los 24 meses el producto mantuvo todos los índices de calidad.

La mezcla 1 se empleó para confirmar el tiempo de retención de las señales de imidazol y compuesto relacionado A y el cumplimiento de los valores límites de estos compues-

tos. En ningún tiempo de estudio, las concentraciones de los productos de degradación, en las muestras evaluadas, sobrepasaron los de las sustancias de referencia.

CONCLUSIONES

La especificidad del método cromatográfico permite identificar los productos de degradación conocidos y aquellos que pudieran aparecer como consecuencia de condiciones inapropiadas de almacenamiento y ninguno de ellos afecta la cuantificación del ácido zoledrónico. El método analítico resultó lineal, exacto y preciso; lo cual permite emplear la técnica validada en el control de calidad y en los estudios de estabilidad del inyectable liofilizado de ácido zoledrónico 5 mg. El inyectable liofilizado, a partir de las mediciones de todos los parámetros de calidad, se mantuvo estable durante los 24 meses de estudio lo cual asegura su inocuidad y efectividad terapéutica.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Leisy Baró Rodríguez, Yamilka Herrera Ledesma, María Isabel Reyes Tur y Marcia Pérez Borrego por su cooperación y sugerencias en el desarrollo de este trabajo

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS

1. V. Prasad, M. Pranothi, P.V. Diwan, C. Kishore, Development of HPLC method for the identification related substances and assay of zoledronic acid in a tablet dosage form, *British Biomedical Bulletin*, **1**(1), 044-055 (2013).
2. A. Brayfield, *Martindale: The complete drug reference*, 38th ed., Pharmaceutical Press, London, 2014, Vol. A, p.1192-1194.
3. J.J. Seaman, B. Galli, H.F. Schran (inventors), Use of zoledronate for the manufacture of a medicament for the treatment of bone metabolism diseases, United States Patent US 20070054885A1, 2007.

4. F. Gonçalves, A.P. Silveira, J. Hebling, C.A. de Souza, Inhibition of osteoblast activity by zoledronic acid, *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, **49**(5), 368-371 (2013).
5. H. Singh, S.K. Mishra, S.S. Parihar, R. Sharma, S. Jain, New potent heterocyclic bisphosphonate API (zoledronic acid): a review, *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, **3**(2), 2372-2392 (2014).
6. L.M. Reddy, K.J. Reddy, P.R. Reddy, A simple RP-HPLC method for related substances of zoledronic acid in pharmaceutical products, *Arabian Journal of Chemistry*, **10**, Suppl 1, s196-s204 (2017).
7. B. Ferraz-de-Souza, P.H. Silveira, Diagnosis and treatment of Paget's disease of bone: a mini-review, *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, **57**(8), 577-582 (2013).
8. Medscape: What is the difference between Zometa® and Reclast®? MedscapePharmacists©, URL: <http://www.medscape.com/viewarticle/715576>, consultado en marzo de 2018.
9. M. Sosa, M. Groba, J.M. Díaz, El ácido zoledrónico en el tratamiento de la osteoporosis, *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, **2**(4), 21-30 (2010).
10. Novartis Pharmaceuticals Corporation: Reclast® (zoledronic acid) Injection©, Novartis, URL: <http://www.pharma.us.novartis.com>, consultado en marzo de 2019.
11. S.R. Nandan, R. Reddy, S. Rao, L.K. Ravindranath, Regulatory requirement-validated, specific, and stability indicating analytical method for zoledronic acid and its related impurities by ion pair reversed phase liquid chromatography (IP-RPLC), *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **32**(16), 2307-2321 (2009).
12. Y. Jiang, X.Q. Zhang, Z.R. Xu, Analysis of zoledronic acid and its related substances by ion-pair RP-LC, *Chromatographia*, **60**, 405-409 (2004).
13. K.M. Praveen, J. Sreeramulu, Stability-indicating RP-HPLC method for determination of zoledronic acid and their degradation products in active pharmaceutical ingredient and pharmaceutical dosage forms, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, **6**(1), 100-104 (2011).

14. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos, *Buenas prácticas para laboratorio de control de medicamentos. Validación de métodos analíticos*. Anexo N.º 1. La Habana, 2013.
15. Farmacopea USP 40-NF 35, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville (MD), 2017, p. 8565.
16. M. Pérez, E. López, M. Fernández, L. Cabrera, M. Acosta, Y. Tusell, Homogeneidad del secado de los inyectables liofilizados ácido zoledrónico y omeprazol. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, **47**(4), 79-85 (2016).
17. Novartis, Dossier del fabricante, Ácido zoledrónico, inyectable liofilizado (4 mg) Suecia, 2007.
18. A. Glausch, R. Löffler, J. Sigg (inventors), Pharmaceutical products comprising bisphosphonates, United States Patent US7032241B2, 2011.
19. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos, *Regulación N.º 23. Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de productos farmacéuticos nuevos y conocidos*, La Habana, 2000.
20. Drugbank: Zoledronic acid, Canadian Institutes of Health Research. Alberta Innovates - Health Solutions. The Metabolomics Innovation Centre (TMIC), URL: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00399>, consultado en abril de 2020.
21. G.H. Nancollas, R. Tang, R.J. Phipps, Z. Henneman, S. Gulde, W. Wu, R.G.G. Russell, F.H. Ebetino, Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: Differences in interactions with hydroxyapatite, *Bone*, **38**(5), 617-627 (2006).
22. R.G. Bates, G.D. Pinching, Resolution of the dissociation constants of citric acid at 0 to 50°, and determination of certain related thermodynamic functions, *Journal of the American Chemical Society*, **71**(4), 1274-1283 (1949).

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

Y. Troche-Concepción, N. Burguet-Lago, A.N. Baeza-Fonte, G. Toledo-Carrabeo, M. Fernández-Cervera, Y. Herrera-Espino, Desarrollo de un inyectable liofilizado de ácido zoledrónico 5 mg. Estudio de estabilidad, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **51**(2), 539-556 (2022). <http://dx.doi.org/10.15446/rcciquifa.v51n2.105101>