

## Validación de un método analítico para determinar la estabilidad en uso del inyectable docetaxel-10 mg/mL

Validation of an analytical method to determine stability in use of injectable Docetaxel-10 mg/mL

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>

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

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

### RESUMEN

**Introducción:** El docetaxel es un fármaco semisintético de demostrada actividad antitumoral aprobado para el tratamiento de pacientes con cáncer de pecho, de próstata hormono refractario y gástrico, localmente avanzados o metastásicos. Se administra mediante infusión intravenosa lenta, por lo que es necesario realizar un estudio de estabilidad en uso para avalar que el producto es estable en esas condiciones.

**Objetivo:** Validar un método analítico para determinar la estabilidad en uso del inyectable docetaxel-10 mg/mL.

**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 232 nm. Se usó una fase móvil compuesta por una mezcla metanol: acetonitrilo: agua (44:26:30), con velocidad de flujo de 1,5 mL/min. La curva de calibración se realizó en el intervalo de 0,125 mg/mL a 0,375 mg/mL.

**Resultados:** El método fue lineal, con un coeficiente de correlación igual a 1,0. Las pruebas estadísticas para el intercepto y la pendiente se consideraron no significativa y significativa, respectivamente. El coeficiente de variación en el estudio de la repetibilidad fue igual a 0,25 % para las seis réplicas ensayadas, mientras que en los análisis de la precisión intermedia las

pruebas de Fischer y t de Student fueron no significativas. Se obtuvo un recobrado del 100,43 % en el intervalo de concentraciones estudiado y las pruebas de Cochran y t de Student resultaron 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, exacto y específico en el intervalo de concentraciones estudiadas.

**Conclusiones:** El método analítico validado para determinar la estabilidad en uso del inyectable docetaxel-10 mg/mL, resultó ser lineal, preciso, exacto y específico en el intervalo de concentraciones establecido entre 0,125-0,375 mg/mL. Los resultados permiten utilizar el método para la realización del estudio de estabilidad en uso del producto en soluciones de dextrosa 5 % y cloruro de sodio 0,9 %.

**Palabras clave:** HPLC/métodos; docetaxel; validación; estabilidad en uso.

## ABSTRACT

**Introduction:** Docetaxel is a semi-synthetic drug with demonstrated antitumor activity approved for the treatment of patients with breast cancer, hormone- refractory prostate cancer and gastric cancer, locally advanced or metastatic. It is administered by slow intravenous infusion, so it is necessary to carry out a stability study in use to guarantee that the product is stable in these conditions.

**Objective:** Validate an analytical method to determine the stability in use of the injectable docetaxel-10 mg/mL.

**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 232 nm. A mobile phase composed of a mixture of methanol: acetonitrile: water (44:26:30), with a flow rate of 1.5 mL/min, was used. The calibration curve was performed in the range of 0.125 mg/mL to 0.375 mg/mL.

**Results:** The method was linear, with a correlation coefficient equal to 1.0. Statistical evidence for intercept and slope was considered non-significant and significant, respectively. The coefficient of variation in the repeatability study was equal to 0.25% for the six replicates tested, while in the intermediate accuracy analyses the Fischer and Student's t tests were not significant. A recovery of 100.43% was obtained in the range of concentrations studied and the Cochran 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, accurate and specific in the range of concentrations studied.

**Conclusions:** The validated analytical method to determine the stability in use of the injectable docetaxel-10 mg/mL, turned out to be linear, precise, accurate and specific in the range of concentrations established between 0.125-0.375 mg/mL. The results allow to use the method for the realization of the stability study in use of the product in solutions of dextrose 5 % and sodium chloride 0.9 %.

**Keywords:** HPLC/methods; docetaxel; validation; stability in use.

Recibido: 27/10/2021

Aceptado: 02/04/2022

## Introducción

El docetaxel es un agente citotóxico de segunda generación perteneciente al grupo farmacológico de los “taxanos”. Estos se obtienen a partir de la corteza del tejo, *Taxus baccata*, un árbol que produce sustancias tanto tóxicas (taxanos) como medicinales (taxol). Es un medicamento antimitótico que se une preferentemente a la subunidad  $\beta$  de la tubulina estabilizando los microtúbulos e inhibiendo la despolimerización que es esencial para las funciones celulares vitales durante la mitosis y la interfase. La ruptura del equilibrio celular cambia la estructura celular y sus funciones, lo que conduce a la detención del ciclo celular, principalmente en la fase G2 / M, y, lo que resulta en apoptosis. Por tanto, el docetaxel favorece el ensamblaje de tubulina en microtúbulos estables e inhibe su desmontaje, disminuyendo el nivel de tubulina libre.<sup>(1,2,3)</sup>

El docetaxel ha demostrado tener una actividad antitumoral significativa contra varios cánceres humanos, entre los que se encuentran el glioblastoma metastatizado, el cáncer de mama metastásico positivo para HER-2 y el cáncer de pulmón.<sup>(3)</sup> Es producido y comercializado en nuestro país por los Laboratorios AICA<sup>+</sup> en forma de concentrado para infusión intravenosa (40 mg/mL) de conjunto con su correspondiente diluyente (etanol 13 %). Este producto se administra por infusión intravenosa lenta diluido en soluciones

parenterales de dextrosa 5 % o cloruro de sodio 0,9 % en el intervalo de concentración de 0,3 a 0,74 mg/mL.<sup>(4)</sup>

Uno de los parámetros que se emplea para determinar la estabilidad en uso de este producto es la valoración. Actualmente en los laboratorios AICA<sup>+</sup> no se cuenta con una técnica analítica que permita realizar esta determinación en las condiciones de uso. El método reportado en la Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP por sus siglas en inglés) para valorar el docetaxel tiene una duración de 60 min,<sup>(5)</sup> tiempo que no es apropiado para realizar un estudio de estabilidad en uso. Por ello se decidió usar la técnica analítica desarrollada para la valoración del principio activo al diseñar el producto,<sup>(6)</sup> que tiene una duración de 10 min.

El objetivo del estudio fue validar un método analítico para determinar la concentración de docetaxel durante el estudio de la estabilidad en uso del inyectable docetaxel-10 mg/mL, en soluciones de dextrosa 5 % y cloruro de sodio 0,9 %.

## Métodos

Se utilizó un patrón de referencia química de Docetaxel USP lote R021Y0 y los lotes DC11901A y DD11807 del inyectable y su diluyente, respectivamente. Todos los reactivos utilizados fueron de grado HPLC. En el ensayo se usó un cromatógrafo (Shimadzu) con detector UV/VIS (Shimadzu) ajustado a 232 nm, un inyector con un bucle de 100  $\mu$ L y un software LabSolution versión 5.97 (Shimadzu Corporation, Copyright 2008-2019). La separación se realizó isocráticamente utilizando una columna Merck 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 Agua, Acetonitrilo y Metanol en las proporciones 30:26:44. Se inyectaron 20  $\mu$ L y el tiempo total de la corrida fue de 10 min. Los parámetros de aptitud del sistema fueron: coeficiente de variación (CV)  $\leq$  2 %, resolución  $\geq$  2, número de platos teóricos  $\geq$  3900 y simetría de 0,8 - 1,2.

La solución de referencia se obtuvo disolviendo 12,5 mg del patrón de referencia de docetaxel trihidratado, en un matraz volumétrico de 50 mL con 30 mL de etanol absoluto y completando a volumen con fase móvil, para lograr una solución con una concentración final de 0,25 mg/mL. En la preparación de la solución de ensayo para la valoración se tomaron cinco bulbos de la muestra, que fueron reconstituidos con cinco bulbos de diluyente y

mezclados. Posteriormente se tomó el volumen necesario para preparar disoluciones con concentraciones en el rango de 0,3 a 0,74 mg/mL en bolsas de suero de cloruro de sodio 0,9 % y dextrosa 5 %. Se tomó una alícuota de 5 mL que se vertió en un volumétrico de 10 mL y llevó a volumen con fase móvil, para lograr disoluciones con concentraciones finales de entre 0,125 y 0,37 mg/mL.

### Validación del método analítico

La validación fue realizada según la categoría I (USP-42) y la RESOLUCIÓN 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>(7,8,9)</sup>

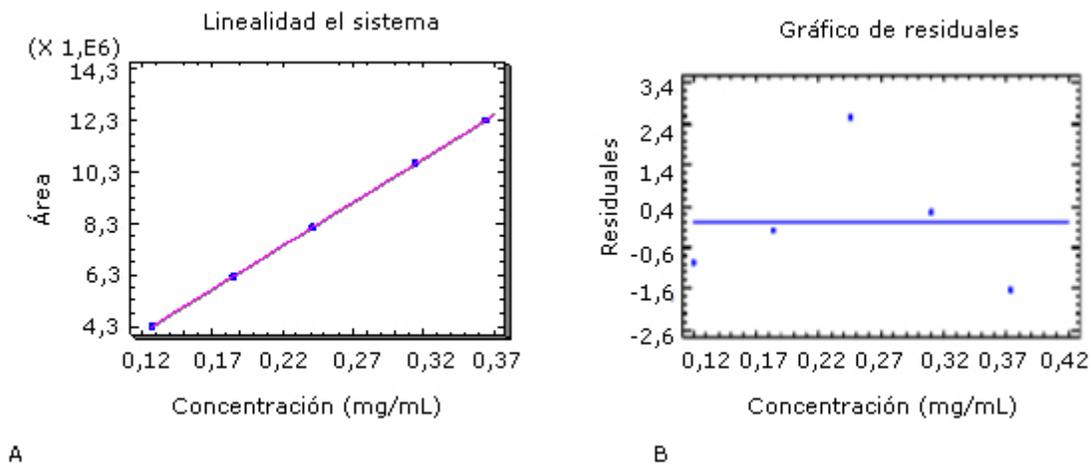
- Linealidad: para el análisis de la linealidad se realizó el modelo de tres determinaciones para cinco concentraciones diferentes: 50 %, 75 %, 100 %, 125 %, y 150 %, de la concentración de trabajo propuesta para el método. Se determinó la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación, la prueba de significación estadística del intercepto y de la pendiente y el coeficiente de variación de los factores de respuesta.
- Precisión intermedia: para el estudio de la precisión intermedia se aplicó el modelo de seis réplicas y dos analistas, dos días. Se aplicaron las pruebas de Fisher y t de Student ( $n = 12$ ) y de ANOVA ( $n = 24$ ), para determinar si existían diferencias significativas entre los resultados al variar las condiciones de análisis.
- Repetibilidad: para el análisis de repetibilidad se realizó el modelo de tres réplicas para tres concentraciones diferentes: 80 %, 100 %, 120 %. Con ellas se determinaron los valores medios, la desviación estándar, el coeficiente de variación y la G de Cochran.
- Exactitud: para el ensayo de la exactitud se utilizaron cinco valores de concentración que correspondieron al 50 %, 75 %, 100 %, 125 % y 150 %. Su preparación se realizó mediante el método de los placebos cargados, para esto se empleó el lote DCT 20190805 de Docetaxel Trihidratado, del fabricante Shanghai Jinhe Bio-Pharmaceutical Co. Se determinaron el porcentaje de recuperación, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Se aplicó además el ensayo de Cochran ( $n =$

- 15) 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 el material de referencia de docetaxel, un placebo, las muestras del producto terminado 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), termólisis y fotólisis. Criterio de aceptación: no debían obtenerse señales del placebo y de los productos de degradación en la zona de elución del principio activo. Las áreas bajo las curvas del patrón y de la del producto terminado debían ser similares.

## Resultados

Al evaluar la aptitud del sistema se obtuvo  $CV = 0,03$ , resolución = 21,694, simetría = 1,106 y número de platos teóricos = 8433.

En la figura 1 se muestran los resultados del estudio de la linealidad el sistema.



**Fig. 1** - Gráficos correspondientes a: A) regresión lineal y B) residuales correspondientes a la regresión lineal realizada.

Se obtuvo que la ecuación de la recta para la regresión realizada fue:

$$\text{Área} = 0,00194733 + 3,38367 \times 10^7 * \text{concentración.}$$

Los valores de  $p$  para las pruebas de hipótesis del intercepto y la pendiente fueron 0,9305 y 0,000, respectivamente. Estos valores corroboran que el intercepto es no significativo y la pendiente es significativa, para un  $\alpha = 0,05$ .

El coeficiente de correlación lineal fue 1. Se obtuvo gran similitud entre los valores, lo que indica una buena correlación (Tabla 1).

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

X	Y	F	Criterios estadísticos
0,1279	4328773,00	33836701,71	$\bar{X} = 33836701,83$ $CV = 2,24384 \times 10^{-07}$
0,1849	6257684,67	33836701,90	
0,2413	8163073,33	33836701,88	
0,3147	10649591,00	33836701,83	
0,3644	12328617,67	33836701,80	

El valor de la media total fue cercano a 100 (Tabla 2).

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

Día	Réplicas	Analista 1 (%)	Analista 2 (%)	Criterios estadísticos
1	1	100,04	100,44	$\bar{X} = 100,06$ $\sigma = 0,28$ $CV = 0,28$ $F = 1,423710$ $p = 0,707487$
	2	100,04	99,80	
	3	99,57	100,08	
	4	100,26	99,93	
	5	99,70	100,31	
	6	100,26	100,25	
2	7	100,04	100,57	$\bar{X} = 100,09$ $\sigma = 0,25$ $CV = 0,25$ $F = 0,238282$ $p = 0,141501$
	8	100,34	100,39	
	9	100,07	99,68	
	10	99,84	99,86	
	11	100,15	100,12	
	12	100,06	99,93	
<b>Criterios estadísticos</b>		$\bar{X} = 100,03$ $\sigma = 0,23$ $CV = 0,23$ $t = 0,683840$ $p = 0,401676$	$\bar{X} = 100,11$ $\sigma = 0,28$ $CV = 0,28$ $t = 0,320789$ $p = 0,674983$	$\bar{X}_{\text{total}} = 100,07$ $\sigma = 0,25$ $CV_{\text{total}} = 0,25$ $F = 0,378784$ $p = 0,769600$

Todos los CV que estuvieron por debajo del límite establecido (Tabla 3).

**Tabla 3 - Resultados del estudio de repetibilidad**

Concentración (%)	Resultados (%)	Criterios estadísticos
Bajo (75)	79,50	$\bar{X} = 79,41$ $\sigma = 0,27$ CV = 0,34
	79,11	
	79,62	
Medio (100)	99,98	$\bar{X} = 99,77$ $\sigma = 0,19$ CV = 0,19
	99,72	
	99,62	
Alto (125)	121,25	$\bar{X} = 121,27$ $\sigma = 0,31$ CV = 0,26
	120,97	
	121,60	

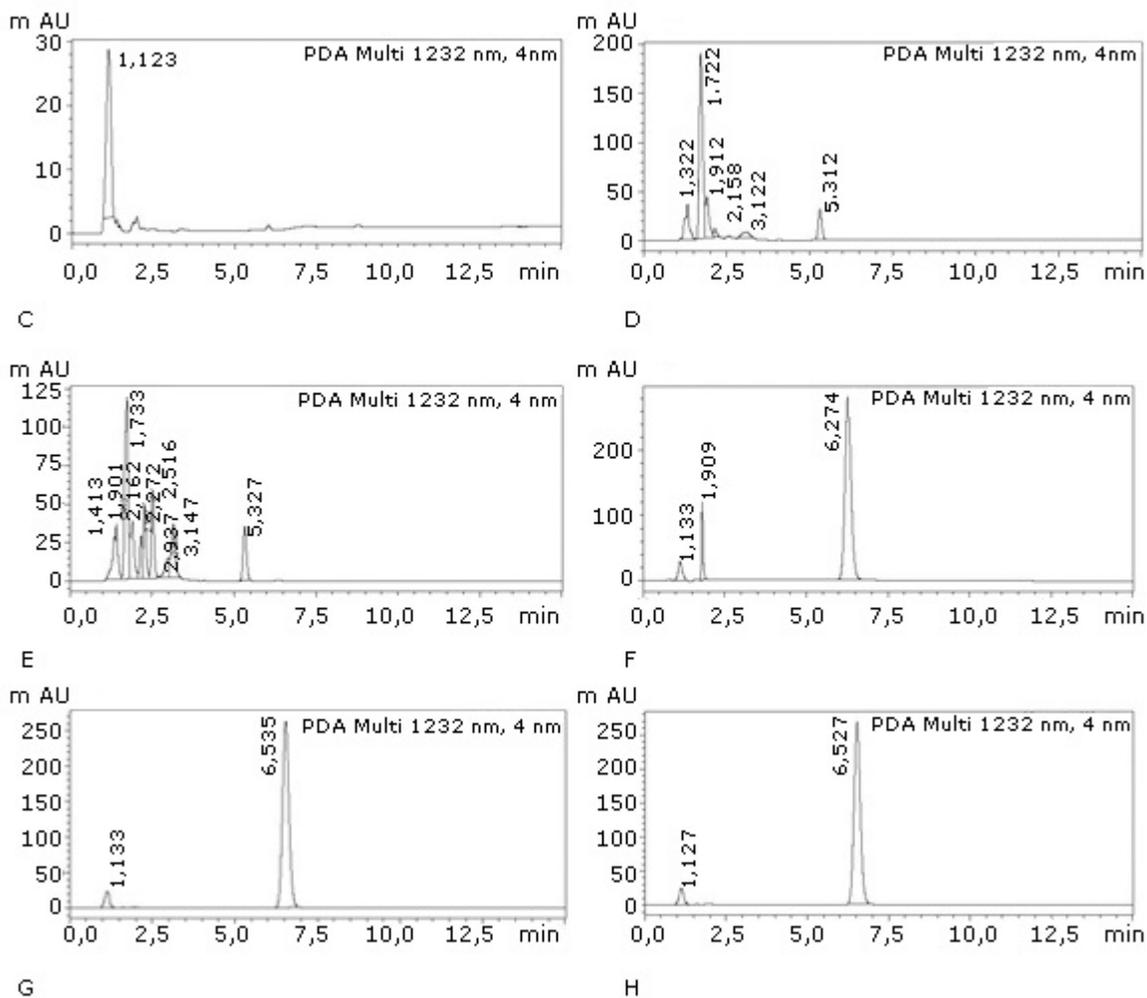
La recuperación media total fue de un 100,43 %, la desviación estándar media fue de 0,39 y el  $CV_{total} = 0,38$  %. En las pruebas de hipótesis de la recuperación media total y de las variaciones entre niveles se obtuvieron valores experimentales de t y G calculados ( $9,91 \times 10^{-07}$  y 0,3624), respectivamente (Tabla 4).

**Tabla 4 - Resultados del estudio de exactitud**

Cantidad adicionada (%)	Cantidad recuperada (%)	Recobrado (%)	Criterios estadísticos
50	50,05	100,10	$\bar{X} = 50,25$ $\sigma = 0,04$ CV=0,08
	50,08	100,16	
	50,13	100,26	
75	75,35	100,46	$\bar{X} = 74,00$ $\sigma = 0,07$ CV= 0,1
	75,23	100,31	
	75,21	100,27	
100	99,71	99,71	$\bar{X} = 100,04$ $\sigma = 0,34$ CV= 0,33
	100,11	100,11	
	100,37	100,37	
125	126,14	100,91	$\bar{X} = 126,84$ $\sigma = 0,36$ CV= 0,28
	125,71	100,56	
	125,4	100,35	
150	151,51	101,01	$\bar{X} = 152,62$ $\sigma = 0,21$ CV= 0,21
	151,73	101,15	
	151,10	100,73	

No se observaron señales en la zona de interés en el cromatograma del placebo (Fig. 2). La aparición de picos secundarios se atribuye a posibles productos de degradación, los que al compararlos con la señal del pico principal obtenida en los cromatogramas del material de

referencia (Fig. 2 A) y de la muestra de docetaxel en el inyectable (Fig. 2 B), demuestran que no interfieren en la determinación del principio activo.



**Fig. 2 -** Cromatogramas correspondientes a: A: material de referencia, B: producto inyectable docetaxel 10 mg/mL, C: placebo del inyectable docetaxel 10 mg/mL, D: hidrólisis básica, E: hidrólisis ácida, F: oxidación, G: termólisis y H: fotólisis.

## Discusión

En los resultados del estudio de linealidad se obtuvieron valores de coeficientes de correlación y de determinación de 1 en ambos casos, superiores a los establecidos en la Regulación 40 de 2014 del CECMED (0,99 y 0,98, respectivamente).<sup>(7)</sup> El valor del coeficiente de correlación 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 ( $2,24 \times 10^{-07} \%$ ) 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 no 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 demuestra que hay linealidad y proporcionalidad en el rango de concentraciones escogidas.

En el estudio de precisión intermedia todos los valores de  $p$  obtenidos para las pruebas de Fischer,  $t$  de Student y ANOVA fueron superiores a  $\alpha = 0,05$ . Estos valores demostraron que no existen diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por los analistas en diferentes días, para un 95 % de confianza.

En el estudio de la repetibilidad se alcanzaron coeficientes de variación inferior al límite establecido para los métodos cromatográficos ( $CV < 2,0 \%$ )<sup>(6)</sup> para las tres concentraciones analizadas (80 %:  $CV = 0,34 \%$ ; 100 %:  $CV = 0,19 \%$  y 120 %:  $CV = 0,26 \%$ ). Lo que demuestra que hay una variabilidad mínima en el proceso analítico y que no existen diferencias significativas entre las dispersiones, independiente 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 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  $G$  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, se obtuvo una  $t$  calculada menor que la  $t$  tabulada (2,14), para un 95 % de confianza.<sup>(4)</sup> Los resultados demuestran la capacidad del método para obtener valores cercanos al valor verdadero, se observa una buena exactitud. Al ser el coeficiente de variación total 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, por lo tanto, el método es exacto y a la vez específico.

En los resultados del estudio de especificidad del método no se observan cerca del tiempo de retención del pico principal interferencias de picos correspondientes a los excipientes o a los productos de degradación. 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 presencia de productos de degradación.<sup>(8)</sup>

Se puede concluir que el método analítico validado por cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación del principio activo del inyectable docetaxel 10 mg/mL, resultó ser lineal, preciso, exacto y específico, en el intervalo de concentraciones establecido entre 0,125 mg/mL y 0,370 mg/mL. Los resultados permiten la utilización del método para la realización del estudio de estabilidad en uso del producto en soluciones de dextrosa 5 % y cloruro de sodio 0,9 %.

## Referencias bibliográficas

1. Tanay MA, Armes J, Ream E. The experience of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in adult cancer patients: a qualitative thematic synthesis. *Eur J Cancer Care*. 2017;26(5). DOI: [10.1111/ecc.12443](https://doi.org/10.1111/ecc.12443)
2. Stoicescu EA, Burcea M, Iancu RC, Zivari M, Popa Cherecheanu A, Bujor IA, *et al*. Docetaxel for Breast Cancer Treatment-Side Effects on Ocular Surface, a Systematic Review. *Processes*. 2021;9(7):1086. DOI: [10.3390/pr9071086](https://doi.org/10.3390/pr9071086)
3. Gallego-Yerga L, Posadas I, de la Torre C, Ruiz-Almansa J, Sansone F, Ortiz Mellet C. Docetaxel-Loaded Nanoparticles Assembled from  $\beta$ -Cyclodextrin/Calixarene Giant Surfactants: Physicochemical Properties and Cytotoxic Effect in Prostate Cancer and Glioblastoma Cells, *Frontiers in Pharmacology*. 2017;8:249. DOI: [10.3389/fphar.2017.0024](https://doi.org/10.3389/fphar.2017.0024)
4. Colectivo de autores. Monografía “Docetaxel”, *Handbook on Injectable Drugs*. Wisconsin: American Society of Health-System Pharmacists, 20 Ed. 2018 vol. 18 p. 402-406.
5. The United States Pharmacopeial Convention. *Farmacopea de los Estados Unidos*. 42 ed. Estados Unidos de América NF-37. Rockville: Mack Printing; 2019.

6. Izquierdo A. “Determinación de Docetaxel, inyectable 80 mg/bbo, CIDEM, Técnica No. PT11009. La Habana: CIDEM; 2009.
7. 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.
8. 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.
9. 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**

*Conceptualización:* Thais Valdés Parra, Carlos Rafael Romeu Carballo.

*Curación de datos:* Thais Valdés Parra.

*Análisis formal:* Thais Valdés Parra.

*Investigación:* Thais Valdés Parra, Carlos Rafael Romeu Carballo.

*Metodología:* Carlos Rafael Romeu Carballo.

*Validación:* Thais Valdés Parra.

*Visualización:* Thais Valdés Parra.

*Administración de proyecto:* Carlos Rafael Romeu Carballo.

*Supervisión:* Carlos Rafael Romeu Carballo.

*Redacción - borrador original:* Thais Valdés Parra, Carlos Rafael Romeu Carballo.

*Redacción - revisión y edición:* Thais Valdés Parra, Carlos Rafael Romeu Carballo.