

Desempeño del método analítico en el estudio de la estabilidad en tiempo real de la succinilcolina-50 mg/ml como solución inyectable

Performance of the Analytical Method for the Study of the Real-time Stability of Succinylcholine-50 mg/ml as an Injectable Solution

Nancy Burguet Lago^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-4413-1294>

Leisy Baró Rodríguez¹ <https://orcid.org/0000-0002-5009-1196>

Yenilen Troche Concepción¹ <https://orcid.org/0000-0002-4069-1446>

Griset Toledo Carrabeo¹ <https://orcid.org/0000-0001-9235-3556>

María Victoria Martínez Betancourt¹ <https://orcid.org/0000-0001-6385-9435>

¹Unidad de Desarrollo e Innovación-Empresa Laboratorios AICA. La Habana. Cuba.

*Autor para la correspondencia: nburguet@aica.cu

RESUMEN

Introducción: El estudio de estabilidad está entre los criterios básicos a tener en cuenta cuando se desarrolla un producto farmacéutico, para obtener información segura de este.

Objetivo: Evaluar el desempeño del método analítico en el estudio de la estabilidad en tiempo real de la succinilcolina-50 mg/ml como solución inyectable.

Métodos: Se realizó la descripción y desempeño del método por cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación del ingrediente farmacéutico activo en el producto terminado, que se complementó con las características organolépticas, esterilidad, endotoxinas bacterianas, pH y conteo de partículas; a los lotes S19003, S19004 y S19005. El estudio de estabilidad se efectuó con una frecuencia de tres meses durante el primer año, y posteriormente cada seis hasta cumplir los 24 meses.

Resultados: En la descripción y desempeño del método quedaron establecidas las condiciones cromatográficas para el ensayo, se demostró que es específico, preciso y exacto; adecuado para el análisis del cloruro de succinilcolina como control de calidad y estudios de estabilidad. Se definió 400 mL de agua peptonada 1g/L como volumen de lavado para el ensayo de esterilidad (método de filtración por membrana) y 1:100 como dilución de trabajo para la determinación de endotoxinas bacterianas (método de lisado de amebocitos del *Limulus*). El comportamiento del pH (dentro de los índices de especificación) tuvo similitud al estudio en condiciones aceleradas, la tendencia a la disminución en la valoración, aún dentro de los valores de especificación, concuerda con lo descrito por otros autores para este producto. Durante los meses de estudio todos los ensayos fisicoquímicos y microbiológicos cumplieron con las especificaciones establecidas para el producto.

Conclusiones: El estudio de estabilidad a tiempo real confirmó el período de validez del producto terminado y las condiciones adecuadas de almacenamiento en el envase propuesto para su comercialización.

Palabras clave: inyectable; succinilcolina; estabilidad; cromatografía; desempeño de la técnica analítica.

ABSTRACT

Introduction: Stability study is among the basic criteria to be taken into account when developing a pharmaceutical product, in order to obtain safe information from it.

Objective: To evaluate the performance of the analytical method in the study of the real-time stability of succinylcholine-50 mg/ml as injectable solution.

Methods: The description and execution of the high-resolution liquid chromatography method for the quantification of the active pharmaceutical ingredient in the finished product was carried out, which was complemented with the organoleptic characteristics, sterility, bacterial endotoxins, pH and particle count; lots S19003, S19004 and S19005. The stability study was carried out at a

frequency of three months during the first year, and subsequently every six months until 24 months were completed.

Results: In the description and implementation of the method, the chromatographic conditions for the assay were established; it was demonstrated that it is specific, precise and exact; adequate for the analysis of succinylcholine chloride as quality control and stability studies. 400 mL of 1g/L peptonized water was defined as the wash volume for the sterility assay (membrane filtration method) and 1:100 as the working dilution for the determination of bacterial endotoxins (Limulus amoebocyte lysate method). The behavior of pH (within the specification indices) was similar to the study under accelerated conditions, the tendency to decrease in titration, even within the specification values, corresponds to what has been described by other authors for this product. During the months of study all physicochemical and microbiological tests complied with the specifications established for the product.

Conclusions: The real-time stability study confirmed the shelf life of the finished product and the adequate storage conditions in the proposed container for its commercialization.

Keywords: injectable; succinylcholine; stability; chromatography; analytical technique performance.

Recibido: 14/10/2022

Aceptado: 03/12/2022

Introducción

Entre los criterios básicos que hay que tener en cuenta para definir la calidad de los medicamentos, la estabilidad es de particular atención.⁽¹⁾ El propósito de los estudios de estabilidad es proveer evidencia acerca de cómo varía la calidad de una materia prima o producto terminado con el tiempo, bajo la influencia de una variedad de factores tales como: temperatura, humedad y luz; para de esta manera establecer periodos de reprobación o de vida media, así como

las condiciones que se recomiendan para almacenar las materias primas y productos terminados.^(1,2)

Existen varios tipos de estudios de estabilidad, unos que en condiciones de estrés aportan información sobre cómo se comporta el producto ante periodos cortos, fuera de las condiciones establecidas de almacenaje, lo que ayuda en la predicción de sus afectaciones ante cualquier cambio que pudiera ocurrir; otros que en estabilidad acelerada permite monitorear las reacciones de degradación para predecir el periodo de validez bajo condiciones normales en que se encuentran almacenadas, y para la evaluación preliminar de cambios en la producción, formulación y escalado en la etapa de desarrollo del producto.⁽³⁾

La succinilcolina es un agente bloqueador neuromuscular despolarizante de acción ultracorta.^(4,5) Se presenta como cloruro de succinilcolina o cloruro de suxametonio, cuyos productos líderes son Anectine® y Mioflex®. El bloqueo neuromuscular es ampliamente usado en la práctica médica, se usa en anestesiología para controlar la ventilación alveolar, facilitar la intubación traqueal y la ventilación mecánica.^(6,7) Es importante para pacientes críticos que necesitan un mejor manejo de la observancia ventilatoria cuando la sedación y la analgesia son insuficientes, además provee la relajación del músculo esquelético para varios procedimientos quirúrgicos.^(8,9,10)

El uso de la succinilcolina en el mundo clínico data de 1932, cuando West empleó fracciones altamente purificadas en pacientes con tétanos y desórdenes espásticos. Griffith y Jonson reportaron la primera prueba para la relajación muscular en anestesia general en el año 1942.

El empleo de esta sustancia está vigente en la actualidad, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) lo incluyeron en la lista de medicamentos esenciales para el manejo de pacientes que ingresan a unidades de cuidados intensivos (UCI) con sospecha o diagnóstico confirmado de COVID-19.⁽¹¹⁾

La producción en Cuba del medicamento succinilcolina-1 inyección IM, IV se realizaba en la Unidad Empresarial de Base (UEB) Laboratorios Liorad, de la Empresa Laboratorios AICA, con una fortaleza de 50 mg/mL en bulbo de vidrio

incolore de 20R, que en su formulación contiene alcohol bencílico como preservativo. En las visitas poscomercialización los especialistas en anestesiología plantearon que la presentación en bulbos 20R conllevaba a desechar una porción del producto, lo que traía como consecuencia pérdidas económicas y la posibilidad del uso indebido del medicamento.

La Unidad de Desarrollo e Innovación (UDI) de la empresa, como parte del mejoramiento continuo de calidad del producto succinilcolina, emprendió el rediseño de la formulación de este inyectable.⁽¹²⁾ Se cambió la presentación del bulbo y se eliminó el alcohol bencílico (preservativo) debido a que en pacientes de bajo peso podía producir intoxicación grave por acumulación de ácido benzóico y alcohol bencílico al producir deficiente flujo sanguíneo a nivel hepático.⁽¹³⁾

Durante el desarrollo de un producto farmacéutico (una nueva formulación) es responsabilidad del fabricante diseñar y realizar estudios de estabilidad a tiempo real o de vida de estante, para obtener información segura sobre cambios en la calidad de una formulación, en interacción con un envase específico durante el tiempo; y bajo la influencia de las condiciones de almacenaje a la que se sometió. Para ello se requiere analizar lotes del producto terminado (tres como mínimo), y la información de la evaluación de estabilidad.⁽¹⁴⁾

El estudio tuvo como objetivo evaluar el desempeño del método analítico en el estudio de la estabilidad en tiempo real de la succinilcolina-50 mg/ml como solución inyectable.

Métodos

Para el estudio de la estabilidad en tiempo real de los lotes de introducción se empleó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) para la cuantificación del inyectable succinilcolina 50 mg/mL en solución.

El estudio se centró en la cuantificación del inyectable succinilcolina 50 mg/mL en solución, y se dividió en cuatro etapas:

- Descripción de la técnica para la valoración por CLAR.

- Evaluación del desempeño de la técnica analítica.
- Descripción de otros ensayos físico-químicos y microbiológicos.
- Estudio de estabilidad a tiempo real.

Descripción de la técnica para la valoración por CLAR

Se tuvo en cuenta el método de análisis descrito en la USP 37 del 2014, que se tomó como referencia el momento inicial de este trabajo. Esta técnica coincide con la bibliografía actual (USP 43, 2020). En lo adelante, se hace referencia a esta última⁽¹⁵⁾ para la valoración del cloruro de succinilcolina producto terminado, esta se basó en la cuantificación directa de este IFA contra una sustancia de referencia. Para realizar este ensayo se empleó la sustancia química de referencia de calidad USP, reactivos y solventes de grado CLAR y agua ultrapurificada.

Se utilizó un cromatógrafo líquido KNAUER compuesto por bomba de doble pistón recíprocante K1000, detector UV-Vis de longitud de onda variable K2600, horno de columna 4050 y autoinyector 3950, todos de la línea Smartline (Alemania). El *software* empleado fue el Clarity.

Las condiciones cromatográficas establecidas para un sistema isocrático de fase reversa fueron: fase móvil (cloruro de tetrametilamonio 1N en 1000 mL de metanol, pH = 3,0), volumen de inyección (20 µL), flujo de fase móvil (0,75 mL/min), longitud de onda (214 nm), columna con material de relleno L3 (Apollo Sílica 5 µm, 250 x 4,6 mm) (Grace, Alemania), factor de simetría no mayor de 2,5 y desviación estándar relativa para inyecciones repetidas de la sustancia de referencia no mayor de 1,5 %. En la preparación de la fase móvil se preparó una solución de cloruro de tetrametilamonio 1 mol/L en metanol, en una proporción 1:10 y se ajustó con ácido clorhídrico a pH = 3,0.

En la preparación de la sustancia de referencia USP se tomaron 88 mg de sustancia de referencia cloruro de succinilcolina USP, y se disolvieron en 4 mL de agua ultrapurificada en un volumétrico de 10 mL para luego completar a volumen con fase móvil (8,8 mg/mL).

En la preparación de la muestra se tomaron 4 mL de la muestra (equivalente a 80 mg de cloruro de succinilcolina) y se disolvieron en 10 mL de fase móvil (8 mg/mL).

Durante el procedimiento se acondicionó el cromatógrafo, para lo que se empleó la fase móvil preparada, con las condiciones descritas anteriormente. Se inyectaron en el cromatógrafo 20 µL de la solución de sustancia de referencia USP y tres réplicas de cada lote de succinilcolina. Se registraron los cromatogramas y las respuestas de los picos principales. Para el cálculo de la cantidad de succinilcolina (%) (SC) se utilizó la ecuación 1.

$$\% SC = (Cp/Cm)(Am/AP) \times 100 \quad (1)$$

Donde:

Cp: concentración de la sustancia de referencia (mg/mL).

Cm: concentración de la muestra (mg/mL).

Am: área de la muestra.

Ap: área de la sustancia de referencia.

El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la preparación de la muestra debe ser igual al obtenido en la preparación de referencia. Se consideraron valores adecuados que oscilaron entre 90 y 110 %, según USP.⁽¹⁵⁾

Evaluación del desempeño de la técnica analítica

Se evaluó a través de los parámetros de exactitud, precisión y especificidad. La metodología experimental, así como los criterios de aceptación fueron los establecidos en la Regulación 41-2007 del CECMED, "Validación de métodos analíticos"⁽¹⁶⁾ y el anexo I: "Validación de Métodos Analíticos del Centro Estatal para el Control de Medicamentos (CECMED)", Cuba, 2014.⁽¹⁷⁾ Los resultados se procesaron con el programa estadístico Statgraphics plus 5.0, Estados Unidos de América.

- Parámetro exactitud:

Al blanco o placebo (agua ultrapurificada) se le adicionaron cantidades conocidas del IFA cloruro de succinilcolina. Se prepararon tres réplicas de cada nivel de concentración (90, 100 y 110 %) con respecto a la solución inyectable (50 mg/mL), correspondiente a 45,0; 50,0 y 55,0 mg/mL. Se calculó el porcentaje de recobrado (R) en cada nivel a través de la ecuación 2:

$$R = \frac{(A \times 100)}{B} \quad (2)$$

Donde:

R: recobrado (%).

A: cloruro de succinilcolina recuperado (mg).

B: cloruro de succinilcolina añadido (mg).

Se determinó en cada nivel estudiado. Además, se realizó la prueba de igualdad de las varianzas para determinar si el factor concentración tenía alguna influencia en los resultados para el 95 % de significación.

Criterio de aceptación: $CV \leq 2 \%$; $R 98,0-102,0 \%$; $G_{exp} < G_{tab}$; $t_{exp} < t_{tab}$. El factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

– Parámetro precisión:

Se observó repetibilidad. Se trabajó en la concentración de 100 % (5,0 mL a 25,0 mL con fase móvil), un mismo día, con el mismo analista, en un mismo laboratorio, y se realizaron siete determinaciones.⁽¹⁴⁾ (se determinó el CV).

Criterio de aceptación: $CV \leq 2 \%$.

– Precisión intermedia:

Se analizaron tres réplicas de la concentración al 100 % por triplicado, en dos días diferentes, por dos analistas. Se determinó el coeficiente de variación. Para la comparación de las medias y de las desviaciones estándar se realizó la prueba de contraste de varianzas, respectivamente, para el nivel de 95,0 % de confianza.

Criterio de aceptación: $CV \leq 2\%$. No existieron diferencias significativas entre las medias ni la desviación estándar, ni entre analistas ni días.

- Parámetro especificidad:

Durante la interferencia del placebo se comparó el cromatograma obtenido del placebo, con el cromatograma de la muestra de succinilcolina.

Criterio de aceptación: No interfieren en la cuantificación del IFA.

- Condiciones drásticas de estrés.

Las hidrólisis básica y ácida, así como la oxidación, fueron provocadas por el reflujo con hidróxido de sodio (1 mol/L), ácido clorhídrico (1 mol/L) y con gotas de peróxido de hidrógeno, respectivamente, durante 30 minutos. Además, a la temperatura de 70 °C durante una semana. Se compararon los cromatogramas de las muestras degradadas con los cromatogramas de la muestra sin degradar.

Criterio de aceptación: No interfieren en la cuantificación del IFA.

Descripción de otros ensayos físico-químicos y microbiológicos

- Características organolépticas a través de la inspección visual de cinco bulbos de cada lote elaborado.

Criterio de aceptación: líquido transparente e incoloro, libre de partículas visibles.

- Ensayo de esterilidad se realizó por filtración de membrana, y se utilizaron 20 unidades del producto para cada medio de cultivo como se define en la USP. Además se filtró el contenido total en dos portafiltros.⁽¹⁵⁾ Una vez filtradas las muestras se lavó el filtro con solución diluyente de 1 g/L de concentración. En uno de los portafiltros, se añadió 100 mL de Caldo Triptona Soya (TCS), se incubó a $22,5 \pm 2,5$ °C, y en el otro portafiltros se añadió 100 mL de medio Fluido de Tioglicolato (TIO) que se incubó a $32,5 \pm 2,5$ °C. Ambos medios se crearon durante 14 días con una revisión diaria para evaluar el crecimiento de microorganismos.⁽¹⁵⁾

Criterio de aceptación: los lotes ensayados no pueden presentar crecimiento microbiano en ninguno de los medios ensayados (deben cumplir con la condición de estéril).

- Determinación de endotoxinas bacterianas este ensayo se realizó por el método de lisado de amebocitos del *Limulus* (LAL) y se empleó la variante cromogénica cinética. Se utilizaron muestras de cada lote del producto en ensayo. Los materiales utilizados (puntas de micropipeta con filtro, parafilm, etc.) se adquirieron cumpliendo con la condición de apirogénicos con certificados de calidad, de esta manera se eliminaron posibles falsos positivos.

Para realizar la curva estándar se utilizó el lote de reactivo LAL que se restituyó con 2,0 mL de agua reactivo LAL, y el lote de endotoxinas se restituyó con 4,6 mL de agua reactivo LAL. Se calculó el coeficiente de correlación lineal (r), cuyo resultado debe ser igual o superior a 0,98 para que la prueba sea considerada válida. Se realizó la curva estándar y se calculó el coeficiente de correlación lineal. Este debe ser $r \geq 0,98$.⁽¹⁵⁾

Las muestras a evaluar se mezclaron con el reactivo LAL, se colocaron en un lector de microplacas acoplado a una computadora que de manera automática monitoreó el tiempo que demoró en aparecer la coloración amarilla (tiempo de reacción), el cual es inversamente proporcional a la concentración de endotoxinas presentes en la muestra. La concentración de endotoxinas en las muestras se calculó contra la curva estándar de endotoxina.

Criterio de aceptación: No más que 2,0 UE/mg.

- Otros ensayos
 - Determinación de pH, conteo de partículas materiales según lo especificado en la Farmacopea de los Estados Unidos de América, USP.⁽¹⁵⁾

Estudio de estabilidad a tiempo real

Se realizaron en tres lotes (industriales) de introducción de la reformulación del inyectable succinilcolina 50 mg/mL, a los que se les evaluó la estabilidad a tiempo real o vida estante. También se realizó estudio de estabilidad acelerada pero los resultados no son objeto de esta investigación, por lo que no se tuvieron en cuenta. Los lotes se almacenaron a temperatura de 2-8 °C, con una frecuencia de análisis de tiempo inicial, 3, 6, 9, 12, 18 y 24 meses.

Durante el período del estudio se evaluaron los caracteres organolépticos, pH, valoración (cuantificación del IFA en el producto terminado), conteo de partículas, esterilidad y endotoxinas bacterianas.

Resultados

La prueba de exactitud del método mostró la relación lineal entre las cantidades adicionadas y recobradas (fig. 1).

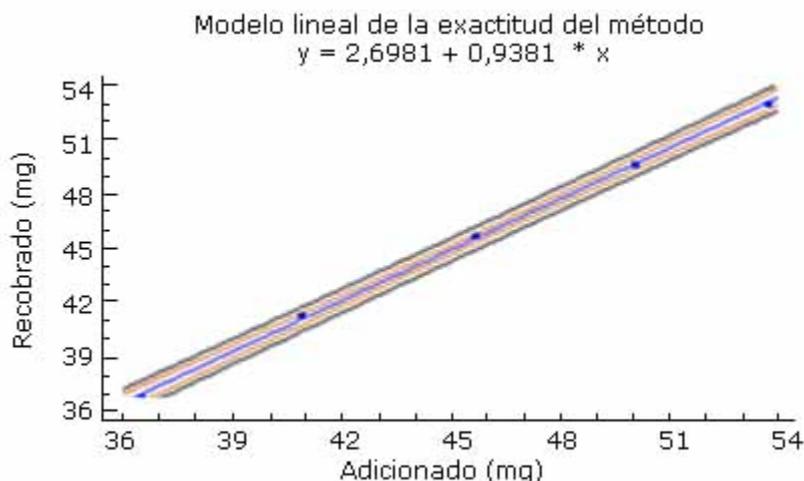


Fig. 1 Resultados de la prueba de exactitud.

La prueba de repetibilidad que desarrolló un analista en el mismo día y los datos de la precisión intermedia desarrollados por dos analistas en días diferentes permitieron asegurar la precisión del método en estudio (anexo).

En el caso de la especificidad, los resultados se mostraron a través de los cromatogramas correspondiente al placebo, la sustancia de referencia de succinilcolina y la muestra, y no se observó ninguna señal en el tiempo de retención del pico principal de la succinilcolina 8-10 min (fig. 2).

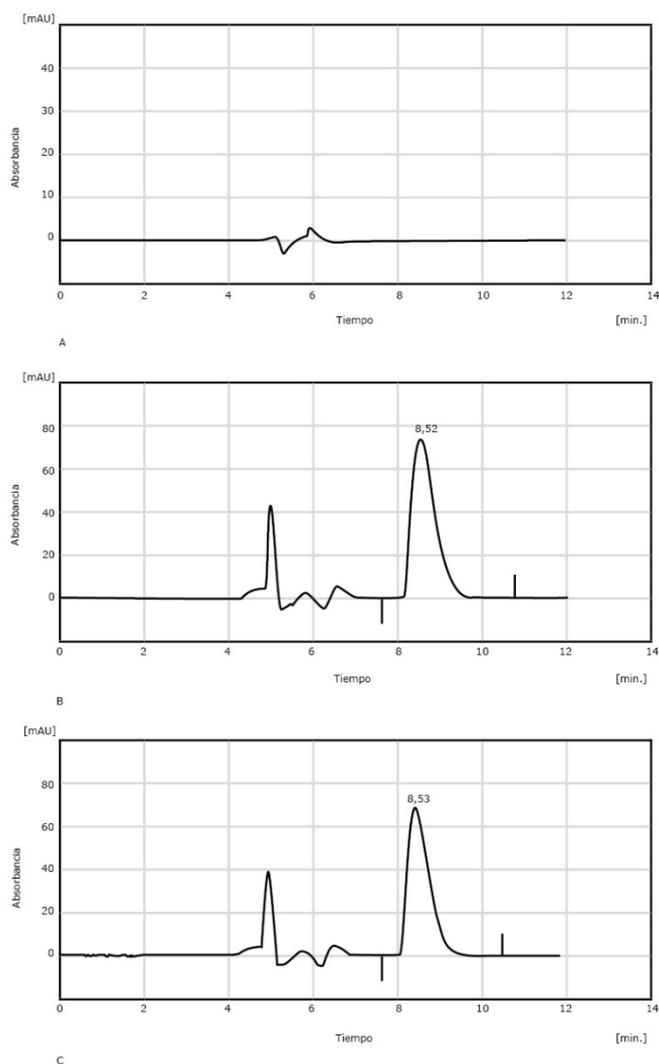


Fig. 2 –Cromatogramas correspondientes a A) placebo, B) sustancia de referencia de succinilcolina y C) la muestra.

La hidrólisis ácida tuvo una disminución de un 25 % en el área bajo la curva, con respecto al producto sin degradar y para la básica fue de un 65,1 % (fig. 3). En el caso de procesos oxidativos la disminución fue de un 56 %. En la muestra sometida a termólisis (degradaciones con calor) y a la luz solar se observaron resultados similares, una disminución de un 22 % y 20 %, respectivamente. La figura 3F muestra el cromatograma de una sustancia de referencia de un producto de degradación.

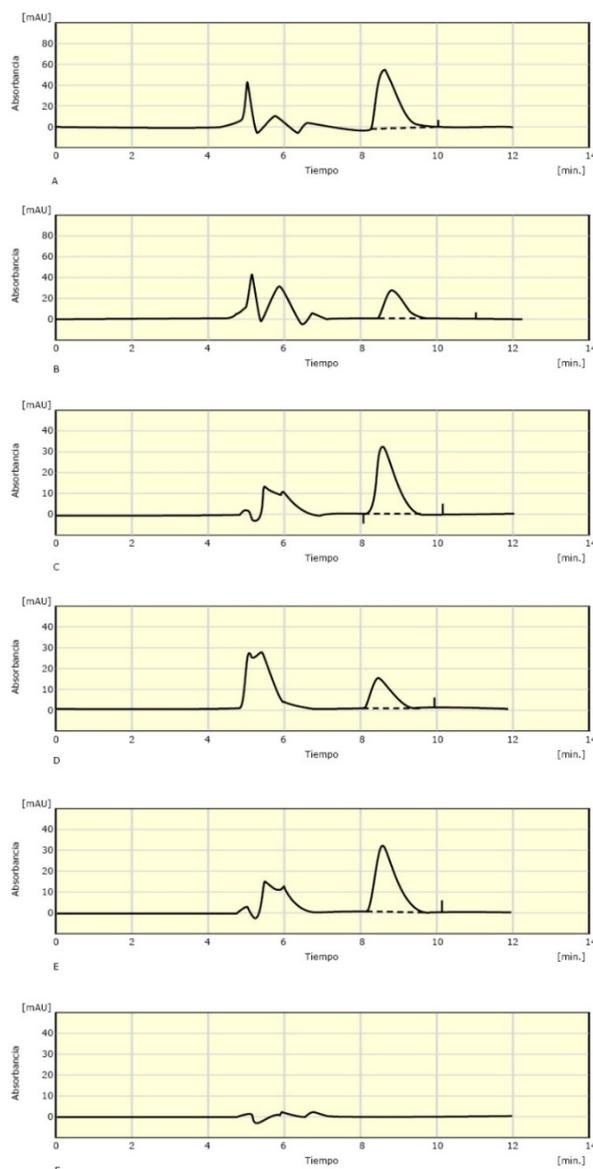


Fig. 3 – Cromatogramas correspondientes a A) hidrólisis ácida, B) básica, C) termólisis, D) oxidación, E) exposición a la luz solar y F) sustancia de referencia cloruro de colina.

La estandarización del ensayo de esterilidad mostró crecimiento de los microorganismos en los portafiltros de la forma siguiente: portafiltros A (control positivo): crecimiento correspondiente con los microorganismos de ensayo; portafiltros B (producto + microorganismos): mostró crecimiento; portafiltros C (no producto + microorganismo): mostró crecimiento al tercer día (para bacterias) y quinto (para hongos), se hizo corresponder estos microorganismos con los que se añadieron; portafiltros D: no mostró crecimiento. El crecimiento en ambos portafiltros fue comparable en abundancia, por lo cual el producto no manifestó actividad antimicrobiana en las condiciones del ensayo, o esta fue eliminada de manera satisfactoria con el volumen de lavado ensayado (400 mL) de agua peptonada a una concentración de 1 g/L.⁽¹⁵⁾

El método de lisado de amebocitos del *Limulus* (LAL) permitió conocer que la máxima dilución válida (MDV) en la que se pudo detectar presencia de endotoxinas en la muestra fue de 20 000. La dilución a la cual el producto no mostró interferencia con el método de ensayo y cumplió con el criterio de porcentaje de recuperación establecido en el método, fue 1:100.⁽¹⁵⁾

En la tabla 1 se muestran resultados del estudio de estabilidad a tiempo real (temperatura: 2 a 8°C), de los lotes industriales durante el tiempo objeto de estudio (24 meses).

Tabla 1 – Resultado del estudio de estabilidad a tiempo real durante 24 meses

Ensayo/lote		Tiempo (meses)						
		Inicial	3	6	9	12	18	24
S19003		Inicial	3	6	9	12	18	24
pH		3,5	3,6	3,4	3,3	3,2	3,2	3,1
Endotoxinas bacterianas (EU/mg)		0,39	---	---	---	---	---	0,30
Partículas materiales	≥ 10 µm	32	---	---	---	---	---	53
	≥ 25 µm	1	---	---	---	---	---	0
S19004		Inicial	3	6	9	12	18	24
pH		3,5	3,6	3,4	3,3	3,3	3,2	3,1
Endotoxinas bacterianas (EU/mg)		0,44	---	---	---	---	---	0,30
Partículas materiales	≥ 10 µm	20	---	---	---	---	---	110
	≥ 25 µm	1	---	---	---	---	---	0
S19005		Inicial	3	6	9	12	18	24
pH		3,4	3,6	3,3	3,3	3,3	3,2	3,1
Endotoxinas bacterianas (EU/mg)		0,17	---	---	---	---	---	0,30

Partículas materiales	≥ 10 μm	34	---	--	---	---	---	263
	≥ 25 μm	0	---	--	---	---	---	13

En el ensayo de valoración se observó como el producto en el tiempo disminuía el porcentaje de IFA, con tendencia a un valor inferior a la media 102,3 % sin llegar al límite de especificación (fig 4).

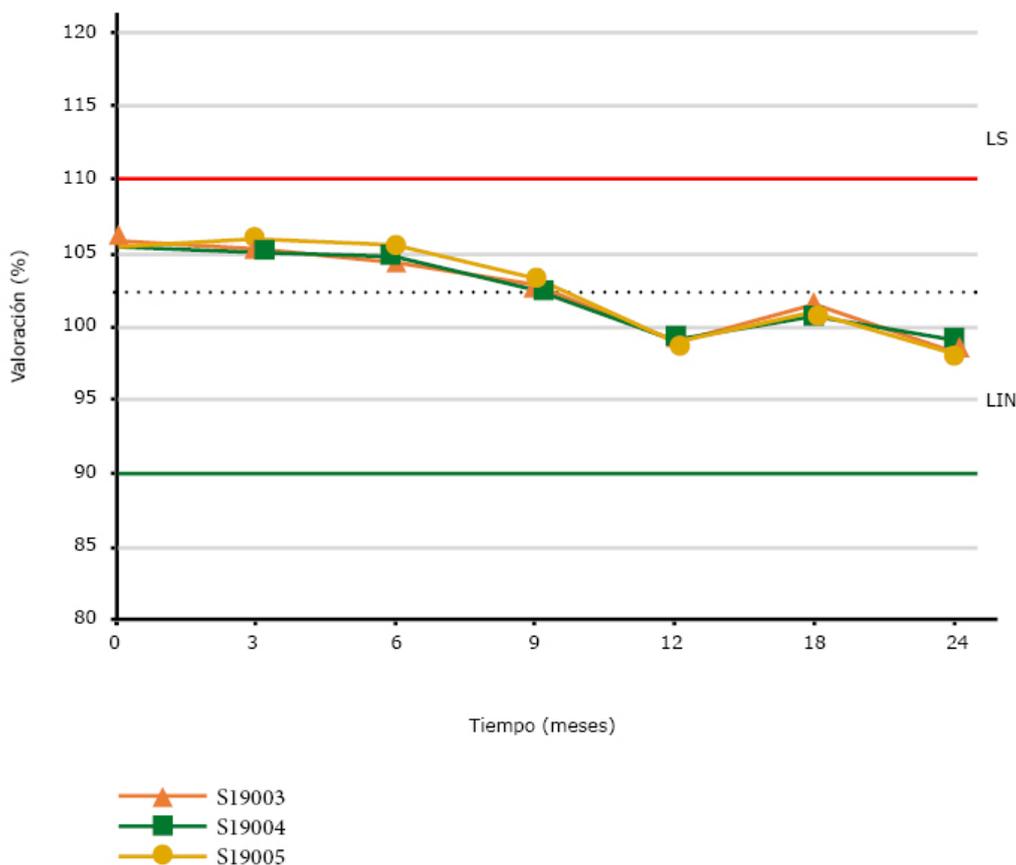


Fig. 4 - Resultado del estudio del ensayo de valoración de estabilidad a tiempo real durante 24 meses.

Las características organolépticas y el ensayo de esterilidad se realizaron como parte del estudio de estabilidad y mostraron todo el tiempo que cumplían con lo especificado para ambos ensayos, líquido transparente e incoloro, libre de partículas visibles y la condición de estéril.

Discusión

La estandarización de los métodos analíticos que se utiliza en la actividad de control desempeña un papel determinante pues de ellos depende la comprobación confiable y reproducible de los índices de calidad del producto terminado, lo cual contribuye, de manera notable, a asegurar su calidad, seguridad y eficacia, además, se pueden utilizar para el estudio de estabilidad.^(16,17)

En la USP 43 (2020) aparece descrita una técnica por CLAR para la valoración de la succinilcolina inyectable⁽¹⁵⁾ en solución acuosa, por lo que es importante realizar la estandarización de este método bajo las condiciones de trabajo de la UDI en la que se realizará el estudio de estabilidad.

Al evaluar la exactitud del método se puede corroborar que el análisis de la regresión mostró la existencia de correlación entre las cantidades adicionadas y las recobradas. Se probó este criterio con los resultados de r que indica la existencia de una relación estadística entre ambas variables y de r^2 que declara la variabilidad en el ensayo. El valor promedio de los residuos demuestra que no existió autocorrelación serial en los residuos para el 95,0 % de confianza.

En el análisis de la exactitud se observa que la recuperación media fue satisfactoria al igual que el coeficiente de variación. La prueba de igualdad de varianzas de los grupos muestrales, prueba de Cochran, evidencia que al ser $G_{exp} < G_{tab}$ estas son equivalentes. Estos resultados se confirman con la prueba t , siendo $t_{exp} < t_{tab}$ por lo que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100 %, de ahí que se considera que el método es exacto.

Al evaluar la repetibilidad se corrobora que los valores del sesgo estandarizado y la curtosis estandarizada se encuentran incluidos en el rango de -2 a +2, por lo que los datos pertenecen a una distribución normal. Se puede plantear que el 95,0 % de las veces contienen la media y la desviación estándar verdaderas. El coeficiente de variación de las determinaciones, a la concentración del 100 %, resultó menor que el 2,0 % establecido para este tipo de ensayo.

En el ensayo de la precisión se observó que los CV eran menores que el 2,0 % establecido como criterio de aceptación. La comparación entre las medias

estableció el intervalo de confianza el cual contiene el valor 0,0 por lo que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las dos muestras para el 95,0 % de confianza. Los resultados mostraron que los valores p fueron mayores de 0,05; lo que confirma el criterio similitud entre las poblaciones.

En cuanto a la especificidad (fig. 2), el hecho de que en los cromatogramas no se observe ninguna señal en el tiempo de retención del pico principal de la succinilcolina (8-10 min.), permite plantear que los componentes de la formulación no interfieren en la cuantificación del IFA.

Los resultados de la degradación del inyectable (fig. 3) evidencian que la muestra sometida a hidrólisis básica sufrió una degradación mayor que la sometida a degradación ácida. Lo anterior era de esperar, ya que el cloruro de succinilcolina es estable a pH ácido.

En el caso de procesos oxidativos la disminución de un 56 % del área bajo la curva con respecto al producto sin degradar se aprecia un pico secundario (5-6 min) como resultado de la degradación de la succinilcolina, no interfiriendo en el tiempo de retención del analito de interés.

Los resultados con la muestra sometida a termólisis y a la luz solar, con respecto al producto sin degradar se corresponden con lo establecido por la bibliografía que refiere la inestabilidad de la succinilcolina por la temperatura.⁽¹⁸⁾

En cuanto al tiempo de retención de la succinilcolina en todos los casos mostró entre 8 y 10 min un pico principal sin cola, con un factor de simetría no mayor de 2,5, lo que indica que se corresponde con el de cloruro de succinilcolina, y entre los 5-6 min un pico secundario (debe corresponderse con los productos de degradación de la succinilcolina), que no aparece en el de la muestra sin degradar por lo que se comprueba que no interfiere con el pico correspondiente al analito de interés (tiempo de retención entre 8-10 min).

La succinilcolina al degradarse se convierte en succinilmonocolina, después en ácido succínico y cloruro de colina como productos finales. La figura 2 F muestra el cromatograma de la sustancia de referencia de uno de estos productos de degradación.

Los resultados en este estudio permiten plantear que tanto los componentes de la formulación, como los productos de degradación, no interfieren en la cuantificación de IFA en el producto terminado. El método cromatográfico evaluado resultó específico, preciso y exacto. Se considera la técnica cromatográfica adecuada para el análisis del cloruro de succinilcolina en el inyectable acuoso, tanto para su control de calidad como para los estudios de estabilidad.

La verificación del ensayo de esterilidad no mostró crecimiento microbiano (ausencia de precipitados y/o floculación) en los lotes estudiados, por lo que se cumplió con el criterio de aceptación. El haber cumplido con el ensayo de esterilidad evidencia que se trabajó bajo los principios de las Buenas Prácticas de Fabricación.⁽¹⁷⁾

En cuanto al ensayo de endotoxinas bacterianas 1:100 se seleccionó como dilución de trabajo para los ensayos de calidad de rutina y los estudios de estabilidad. Los valores de endotoxinas bacterianas se mantuvieron dentro de los límites de especificación reportados, durante todo el estudio.

La disminución de pH en la vida de estante, es un comportamiento conocido para este producto (dentro de los índices de especificación). Según las pendientes de estos valores, para cada lote, se apreció una disminución promedio de 0,02 unidades de pH por mes.

En el ensayo de partículas materiales aún cuando los resultados cumplen con los límites de especificación, llama la atención que respecto al tiempo inicial se incrementaron la cantidad de partículas materiales a los 24 meses. Las autoras toman en cuenta lo planteado por Bichman (2014) que hace referencia a que existen preocupaciones asociadas con la presencia de partículas que se pueden desarrollar con el tiempo mientras el producto está en distribución o almacenamiento.⁽¹⁹⁾

Este resultado puede responder a que, a pesar del control de calidad para velar la exactitud de los resultados a partir de los materiales utilizados y la precisión a partir de un análisis replicado e independiente de los materiales en el ensayo, se pudo incurrir en errores de manipulación por el analista. Por ejemplo, que la agitación de las muestras no sea suave y genere la formación de burbujas que se cuenten como partículas, las técnicas de apertura de los viales o ampollas pueden influenciar los

resultados al diseminar partículas de vidrio o goma en la muestra. Las condiciones ambientales como por ejemplo, no lavar de manera cuidadosa el material de vidrio y conjunto de filtración usados.

Debido a que el método de oscurecimiento detecta las partículas por la “sombra” que dan al ser iluminadas dentro de un tubo capilar, este capilar debe estar limpio para la correcta medición del sistema (paso crítico). La falta de limpieza del capilar afecta a las calibraciones y a las mediciones. Lo anterior indica que si se incurre en cualquiera de estos errores por parte del analista se cuantificarían un mayor número de partículas materiales que no se corresponde con una contaminación de partículas accidentalmente presentes en las soluciones inyectables.

Al evaluar los resultados que se muestran en la figura 4, se observa un comportamiento característico de este producto según está descrito en la USP 43 con un tiempo de vida útil no mayor de los 24 meses.⁽¹⁵⁾ Esto concuerda con la bibliografía consultada (*Handbook on injectable drugs*, 2015),⁽²⁰⁾ en la cual se describe que la descomposición del IFA depende de la concentración y la temperatura. A la concentración de 50 mg/mL el inyectable puede tener una reducción de la descomposición del cloruro de succinilcolina a 0,3 % por mes, en refrigeración. En algunas bibliografías refieren un período de validez inferior, de hasta 18 meses, en las mismas condiciones de almacenamiento y calidad de material de envase según esta forma farmacéutica. (ficha técnica anectine).⁽²¹⁾ Se puede señalar que los valores obtenidos durante todo el tiempo de estudio se encuentran dentro del límite de especificación (90,0-110,0 %).

El estudio de estabilidad a tiempo real de lotes de introducción del inyectable succinilcolina 50 mg/mL en solución, confirmó el periodo de validez del producto terminado, al mantener las propiedades físico-químicas y microbiológicas dentro de los límites de especificación establecidos durante el tiempo de estudio. Se corroboró las condiciones adecuadas en que se almacena el producto en el envase-cierre propuesto para su comercialización, protegido de la luz, a las condiciones de 2 a 8°C de temperatura y con el sistema de envase cierre propuesto. El desempeño del método CLAR para la cuantificación del clorhidrato de succinilcolina resultó específico, preciso y exacto. Se considera la técnica

cromatográfica adecuada para el análisis del cloruro de succinilcolina en el inyectable acuoso, tanto para su control de calidad como para los estudios de estabilidad.

Referencias bibliográficas

1. Hussong D. Sterile Products: Advances and Challenges in Formulation, Manufacturing and Regulatory Aspects - A Regulatory Review Perspective. AAPS Pharm. Sci. Tech. 2010 [acceso 14/07/2021];11(3):1482-85. Disponible en: <https://www.scribd.com/document/295122949/Sterile-Products>.
2. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos médicos (CECMED). Regulación 23-2000 Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de productos farmacéuticos nuevos y conocidos. La Habana: CECMED; 2000 [acceso 29/03/2022]. Disponible en: <http://www.cecmecmed.cu/reglamentacion/registro/aprobadas?page=6>
3. International Conference on Harmonisation (ICH)-Q1A (R2). Stability testing of new drug substances and products. Geneva, Switzerland: ICH; 2003 [acceso 29/03/2022]. Disponible en: <https://www.gmp-compliance.org/guidelines/gmp-guideline/ich-q1ar2-stability-testing-of-new-drugs-and-products-revised-guideline>
4. Vincent A, Bernard L, Léone M. Farmacología de los anestésicos locales. EMC-Anestesia-Reanimación. 2019 [acceso 14/09/2022];45(1),1-19. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/332122720_Farmacologia_de_los_anestésicos_locales
5. Agencia Española de Pediatría (AEP). Succinilcolina. España: AEP; 2020 [acceso 29/03/2022]. Disponible en: <https://www.aeped.es/comite-medicamentos/pediamecum/succinilcolina>
6. Farmacia Informativa. Succinilcolina: Relajante muscular de rápida acción. [s. l.]: Farmaciainformativa.com; 2020 [acceso 29/03/2022]. Disponible en: <https://farmaciainformativa.com/succinilcolina/>
7. Gutiérrez ML. Secuencia de intubación rápida. Badajoz: Servicio de Urgencias Hospital Infanta Cristina; 2017 [acceso 29/05/2021]. Disponible en:

https://www.areasaludbadajoz.com/images/stories/secuencia_intubacion_rapida.pdf

8. Hager HH, Burns B. Succinylcholine Chloride. 2022. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. PMID: 29763160.

9. Kattan E, Merino S. Bloqueo-neuromuscular (BNM) en UCI. Chile: Sociedad Chilena de Medicina Intensiva. 2021 [acceso 18/03/2022]. Disponible en: https://www.medicina-intensiva.cl/site/covid/materiales/Guia_BNM_v4.pdf

10. Lobo DM, Cordero I, Mora I. Eficacia de tres dosis de succinilcolina en la inducción de secuencia rápida. Revista Cubana de Anestesiología y Reanimación. 2019 [acceso 29/11/2021];18(1):14-23 Disponible en: <http://revanestesia.sld.cu/index.php/anestRean/article/view/534/748>

11. Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización Panamericana de la Salud (OPS). Lista de medicamentos esenciales para el manejo de pacientes que ingresan a unidades de cuidados intensivos con sospecha o diagnóstico confirmado de Covid-19. Colombia: Minsalud; 2020. [acceso 29/11/2021] Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/salud/publica/PET/Documents/MEDICAMENTOS%20ESSENCIALES-UCI-COVID-19%20final-25-marzo.pdf>

12. Burguet N, Troche Y, Baró L, Martínez MV, Toledo G. Desarrollo tecnológico e introducción del inyectable succinilcolina 50 mg/mL en el cuadro básico de medicamentos nacional de Cuba. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas. 2021 [acceso 15/02/2022];50(2):339-51 Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8112472>

13. Centro Estatal para el Control de la Calidad de los Medicamentos, Equipos y Dispositivos médicos (CECMED). Resumen de las características del producto: succinilcolina-50. 2018 [acceso 29/05/2021]. Disponible en: <http://www.cecmecmed.cu>

14. Vila JL. Tecnología Farmacéutica: Formas Farmacéuticas. Eds: Síntesis, España. 2001 [acceso 29/03/2022];2:158-61. Disponible en: <https://www.casadellibro.com/libros-ebooks/jose-luis-vila-jato/5013>

15. United State Pharmacopoeia. 2020. Disponible en:

<https://www.webofpharma.com/2021/04/united-state-pharmacopoeia-2020-usp-43.html>

16. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos médicos (CECMED). Regulación 41-2007. Validación de métodos analíticos. La Habana: CECMED; 2007 [acceso 26/02/2022]. Disponible en:

<http://www.cecmecmed.cu/reglamentacion/LNC/aprobadas>

17. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos médicos (CECMED). Anexo No I. De las Buenas Prácticas para laboratorios de Control de medicamentos. Validación de Métodos Analíticos. La Habana: CECMED; 2014 [acceso 29/03/2022]. Disponible en:

<https://es.scribd.com/document/462438942/Validacion-de-metodos-analiticos>

18. ASEFARMA. Conservación de los medicamentos termolábiles. Madrid: ASEFARMA; 2019 [acceso 29/03/2022]. Disponible en:

<https://www.asefarma.com/blog-farmacia/conservacion-de-los-medicamentos-termolabiles>

19. Bichman M. Medición de Partículas en Parenterales. XVI Congreso Internacional de la Organización de Farmacéuticos Ibero-latinoamericanos (OFIL). Asunción, Argentina: OFI; 2014 [acceso 29/03/2022]. Disponible en:

<http://nebula.wsimg.com/140b9908fd19bf7dfe027f55aad543f0?AccessKeyId=8EAC8765C02E3C699CB7&disposition=0&alloworigin=1>

20. McEvoy GK, editor. Handbook on injectable drugs. 18th ed. U.S: American Society of Health-System Pharmacists; 2015 [acceso 29/03/2022]. Disponible en:

<https://www.biblio.com/book/handbook-injectable-drugs-18th-edition-american/d/1328364356>

21. AEMPS. Ficha técnica. Anectine 50 mg/ml solución inyectable y para perfusión. Irlanda: Aspen Pharma Trading Limited Irlanda; 2018. Disponible en:

<https://www.aemps.gob.es>

Anexo

Resultados de la exactitud del método

Nivel	Adicionado (mg/mL)	Área	Concentración hallada (mg/mL)	Varianza	Recuperación (98,0-102,0%)
80	36,54	1240,618	36,82	0,0061	100,77
	36,54	1240,914	36,83		100,79
	36,54	1236,148	36,69		100,41
90	40,92	1355,234	40,23	0,8346	98,31
	40,92	1412,77	41,93		102,47
	40,92	1403,626	41,66		101,81
100	45,67	1541,624	45,76	0,0120	100,20
	45,67	1540,069	45,71		100,09
	45,67	1534,566	45,55		99,74
110	50,06	1647,999	48,91	0,4357	97,70
	50,06	1690,95	50,19		100,26
	50,06	1678,984	49,83		99,54
120	53,71	1763,568	52,35	0,3159	97,47
	53,71	1800,075	53,43		99,48
	53,71	1791,114	53,16		98,98
Media (%)					99,27
CV (< 2,0 %)					1,05
Gexp=0,520					
Gtab ($\alpha=0,05$; k=5; n=3)= 0,788					
texp = 0,3717					
ttab ($\alpha=0,05$; n-1=14)= 1,7613					

Resultados de la repetibilidad del método

Determinación	Respuestas (mV.s)	Valoración (%)
1	1297,1490	103,9955
2	1283,4330	102,8958
3	1293,5130	103,7040
4	1278,2110	102,4772
5	1278,3810	102,4908
6	1280,2320	102,6392
7	1280,2320	102,6392
Promedio		102,9774
Curtosis estandarizada (-2 a +2)	-0,3173	
Sesgo estandarizado (-2 a +2)	1,2003	
CV (≤ 2 %)	0,5995	

Resultados de la precisión intermedia del método

Analistas	Día 1 (%)	Día 2 (%)	Estadísticos
1	99,5493	100,1446	\bar{X} =99,9161 % CV= 0,3631 %
	100,3950	99,6190	
	99,6181	100,1708	
2	99,9865	99,9034	\bar{X} =100,1459 % CV= 0,3403 %
	99,9998	100,0176	
	100,1446	100,8232	
Total	\bar{X} =99,9489 % CV= 0,0250 %	\bar{X} =100,1131 % CV= 0,0310 %	\bar{X} =100,0310 % CV= 0,3562 %

Resultados de la precisión intermedia del método (comparación entre días)

Día		1	2
Promedio		99,9489%	100,1131%
Prueba t	Intervalo de confianza para la diferencia entre las medias	-0,6309 a 0,3025	
	ttab = 1,7959	-0,7840	
	Valor p ($\geq 0,05$)	0,4512	
Prueba F	Desviación estándar	0,3195	0,4014
	Varianza	0,1020	0,1611
	Intervalo de confianza de las varianzas	0,0886 a 4,5268	
	F	0,6334	
Homogeneidad de las varianzas			Valor p
Contraste de Cochram (Gtab) = 0,788		0,6122	0,6285
Contraste de Bartlett		1,0262	0,6279
Test de Levene		0,0643	0,8049

Resultados de la precisión intermedia del método (Comparación entre analistas)

Analista		1	2
Promedio		99,9161	100,1461
Prueba t	Intervalo de confianza para la diferencia entre las medias	-0,6825 a 0,2230	
	ttab = 1,7959	-1,1304	
	Valor p ($\geq 0,05$)	0,2847	
Prueba F	Desviación estándar	0,3628	0,3403
	Varianza	0,1316	0,1162
	Intervalo de confianza de las varianzas	0,1585 a 8,0975	
	F	1,1308	
Homogeneidad de las varianzas			Valor p
Contraste de Cochram (Gtab) = 0,788		0,5312	0,8943
Contraste de Bartlett		1,0019	0,8941

Prueba de Levene	1,05548	0,3284
------------------	---------	--------

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Nancy Burguet Lago.

Administración del proyecto: Nancy Burguet Lago.

Redacción (borrador original): Nancy Burguet Lago.

Supervisión: Nancy Burguet Lago.

Curación de datos: Leisy Baró Rodríguez.

Metodología: Leisy Baró Rodríguez.

Metodología: Yenilen Troche Concepción.

Redacción (revisión y edición): Yenilen Troche Concepción.

Validación: Griset Toledo Carrabeo.

Verificación: Griset Toledo Carrabeo.

Análisis formal: María Victoria Martínez Betancourt.