

Estabilidad en suero fisiológico del busulfán intravenoso en un envase de poliolefinas

J. Nebot Martínez^a, M. Alós Almiñana^a y O. Díez Sales^b

^aServicio de Farmacia. Hospital General de Castellón. Castellón. España.

^bDepartamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universitat de València. Valencia. España.

Resumen

Introducción: Aunque se ha utilizado por vía oral, la variabilidad en su absorción y el riesgo de que se produzcan vómitos, ha impulsado la utilización intravenosa de busulfán. En el presente trabajo se estudiará la estabilidad de 60 mg de busulfán, en volúmenes fijos de 250 ml (0,24 mg/ml) y 500 ml (0,12 mg/ml) de suero fisiológico y diferentes condiciones de conservación, en un nuevo envase de plástico, de lámina construida de poliolefina/poliamida.

Material y métodos: Se empleó la cromatografía líquida de alta eficacia con detección ultravioleta para determinar las concentraciones de busulfán derivatizado con dietilditiocarbamatotrihidrato sódico. La estabilidad se evaluó, para ambas concentraciones, tanto en nevera como a temperatura ambiente, mediante el t_{90} de cada ensayo.

Resultados: El porcentaje de concentración remanente de busulfán a las 24 h siempre fue inferior al 90%. A 25 °C y concentración de 0,24 mg/ml el t_{90} fue de 8,4 h; a 4 °C y concentración de 0,24 mg/ml fue de 16,7 h; a 25 °C y concentración de 0,12 mg/ml fue de 12 h, y a 4 °C y concentración de 0,12 mg/ml fue de 11,5 h.

Conclusiones: El presente estudio demuestra que el busulfán a una concentración de 0,24 mg/ml en suero fisiológico será estable en las bolsas ensayadas durante un período de almacenamiento de 12 h en nevera más las 2 h de administración del fármaco.

Palabras clave: Estabilidad del fármaco. Busulfán. Cromatografía. Líquido de alta presión. Intravenoso.

Stability in serum of intravenous busulfan in a polyolefin pack

Introduction: Although it has been used orally, the variability in its absorption and the risk of causing vomiting has lead to a push towards the intravenous use of busulfan. This study looks at the stability of

60 mg of busulfan, in fixed volumes of 250 mL (0.24 mg/mL) and 500 mL (0.12 mg/mL) of serum and different conservation conditions, in a new plastic pack made from polyolefin/polyamide laminates.

Material and methods: High-efficiency liquid chromatography with ultraviolet detection was used to determine the concentration of busulfan derivate with sodium diethyldithiocarbamatetrihydrate. Stability was assessed for both concentrations; refrigerated and at room temperature, using the t_{90} of each sample.

Results: The percentage of the remaining busulfan concentration at 24 h was always less than 90%. At 25 °C and 0.24 mg/mL concentration, the t_{90} was 8.4 h; at 4 °C and a concentration of 0.24 mg/mL it was 16.7 h; at 25 °C and a concentration of 0.12 mg/mL it was 12 h and at 4 °C and a concentration of 0.12 mg/mL it was 11.5 h.

Conclusions: This study show that busulfan in a concentration of 0.24 mg/mL in serum is stable in the bags tested during a refrigerated storage period of 12 h plus two additional hours of administration of the drug.

Key words: Drug stability. Busulfan. Chromatography. High pressure liquid. Infusions. Intravenous.

INTRODUCCIÓN

El busulfán es un polvo blanco o casi blanco, muy poco soluble en agua¹. Se comporta como un agente electrofílico que actúa específicamente durante la fase S del ciclo celular. Reacciona con átomos nucleofílicos de las bases nucleicas formando puentes inter e intracatenarios en la doble hélice de ADN, que provocan interferencias en los procesos de transcripción y replicación del ADN².

En España las indicaciones del busulfán, según su ficha técnica^{3,4}, varían en función de si se administra por vía oral o intravenosa. Las indicaciones por vía oral son: tratamiento paliativo de la fase crónica de la leucemia granulocítica crónica; remisión prolongada en policitemia vera, especialmente en caso de trombocitosis marcada y determinados casos de trombocitemia esencial, y mielofibrosis. Las indicaciones por vía intravenosa son: seguido de ciclofosfamida, en el tratamiento de acondicionamiento previo al trasplante de células progenitoras hematopoyéticas en pacientes adultos, cuando se considera que la combina-

Correspondencia: Javier Nebot Martínez.

Servicio de Farmacia. Hospital General de Castellón.

Avda. Benicassim, s/n. 12004 Castellón. España.

Correo electrónico: janebot@hotmail.com

Recibido: 11-03-08

Aceptado: 10-09-08

ción es la opción más viable, y seguido de ciclofosfamida o melfalán, en el tratamiento de acondicionamiento previo al trasplante de células progenitoras hematopoyéticas en pacientes pediátricos.

Aunque el busulfán comenzó a utilizarse de forma oral a dosis altas, junto con ciclofosfamida, como esquema de preparación para el trasplante de médula ósea, la ausencia de una presentación adecuada, la variabilidad de absorción y el riesgo de que se produzcan vómitos, impulsa su utilización intravenosa. La pauta habitualmente utilizada de busulfán es de 0,8 mg/kg/6 h durante 4 días por vía intravenosa⁵.

En las distintas farmacopeas consultadas, sólo hay una estabilidad sobre el busulfán comprimidos con límites entre el 93,0 y el 107,0%, valores que se suelen emplear en comprimidos cuyas sustancias activas presentan buenas características de estabilidad. La ausencia de especificación en estas farmacopeas nos permite utilizar la especificación general para preparados inyectables con límites comprendidos entre el 90,0 y el 110,0%, límites que se recogen en las farmacopeas para distintos inyectables como brompheniramina o bumetamina inyectables⁶. Además, este límite se utiliza en preparaciones de busulfán inyectables que se recoge en trabajos previos^{3,7}.

En España la forma intravenosa de busulfán (Busilvex®) se presenta en ampollas de una concentración de 6 mg/ml de busulfán en una mezcla de N,N-dimetilacetamida y polietilenglicol³. Según las instrucciones del fabricante, para la administración intravenosa, las ampollas de Busilvex® se deben diluir en suero fisiológico o glucosa al 5% hasta obtener una concentración de 0,5 mg/ml. Su estabilidad a temperatura ambiente (25 °C) es de 8 h^{3,7}, mientras que conservado en refrigeración (2-8 °C) la mezcla es estable hasta 12 h^{3,7}.

En el presente trabajo se estudiará la estabilidad de una dosis estándar de 60 mg (10 ml) de busulfán en volúmenes fijos de 250 y 500 ml de suero fisiológico, obtenido mediante dilución de un preparado comercial sometido a diferentes condiciones de conservación, en un nuevo envase de plástico de lámina coextruida de poliolefina/poliamida.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material

Para la validación del método cromatográfico y la preparación de las rectas de calibración se empleó busulfán Sigma® como patrón; como agente derivatizante se utilizó el dietilditiocarbamatotrihidrato sódico (DDCT) Sigma®. Se empleó acetonitrilo Sigma-Aldrich® para preparar la disolución de busulfán previa a la preparación de la solución madre para las calibraciones. Otros reactivos empleados en la preparación de la fase móvil fueron: agua bidestilada Fresenius® y Metanol Merk®, de grado analítico.

La preparación de las mezclas intravenosas de busulfán se realizó empleando bolsas de cloruro sódico al 0,9% Viaflo Baxter® de 500 y 250 ml.

Técnica analítica

La técnica utilizada para la determinación del busulfán fue la cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE). El equipo cromatográfico incorporaba un inyector automático Spectra System AS1000, un detector de absorción ultravioleta Waters 484, una bomba Waters 515 y un integrador Penelson NCI900 conectado a un ordenador.

Como fase estacionaria se empleó una columna Kromasil® C18 con un tamaño de partícula de 5 µm y unas dimensiones de 150 × 4,6 mm. Como fase móvil se utilizó una solución compuesta por metanol y agua en proporción 80:20. La fase móvil se preparó mediante filtración en vacío a través de una membrana de 0,45 µm de poro Millipore®.

El flujo de elución fue de 1,5 ml/min. La detección se realizó a una longitud de onda a 251 nm.

Se preparó una disolución estándar madre de busulfán de 25 µg/ml en suero fisiológico. Para ello se pesaron 1,25 mg de busulfán y se disolvieron en 50 ml de acetonitrilo para garantizar su completa disolución. A continuación se diluyó esta mezcla con 950 ml de suero fisiológico. A partir de esta solución madre se prepararon las diluciones patrón en suero fisiológico (25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56 y 0,78 µg/ml). A 500 µl de cada calibrador se le añadió 125 µl de la solución derivatizante (DDCT en agua bidestilada a una concentración de 82 mg/ml⁸). Las mezclas derivatizadas se agitan en Vortex® (Reax 1000) durante un periodo de 30 segundos a temperatura ambiente. Se inyectaron 200 µL de mezcla derivatizada en el sistema cromatográfico mediante un inyector automático. Este proceso se repitió 3 veces para cada dilución patrón.

La exactitud de cada calibrador se determinó a través del error relativo (E_i^j)⁹, calculado como el cociente entre el error absoluto ($E_i^j \times 100$, expresado como la diferencia entre el valor experimental (V_i^j) y el valor interpolado en la recta de calibración (V_i^j), y el V_i^j ($E_i^j = [V_i^j - V_i^j] \times 100 / V_i^j$). En cuanto a la precisión, la bibliografía consultada propone la obtención de los coeficientes de variación (CV_i)¹⁰ calculados como el cociente entre la desviación estándar (DE^j) $\times 100$ y la media de las 3 muestras analizadas de cada calibrador (X^j): ($SD^j \times 100$)/ X^j . La linealidad del modelo se caracteriza por el coeficiente de determinación (r^2).

La validación del método analítico se llevó a cabo tanto intradía como interdía, con el fin de asegurar que en todo momento se estaba dentro de los límites recomendados de exactitud y precisión⁹.

Estudio de la estabilidad química

El estudio presentado simula las condiciones reales de preparación de la mezcla intravenosa, por lo que se admite como volumen inicial del fluido intravenoso y cantidad de medicamento en el envase, los declarados por el fabricante. Así, la mezcla intravenosa se preparó a partir de viales de busulfán (Busilvex® 60 mg/10 ml, Laboratorio Pierre Fabre Iberica), añadiendo 10 ml de la preparación a la bolsa de suero fisiológico previa extrac-

ción de 10 ml de la bolsa. Se emplearon bolsas de 250 y 500 ml de poliolefinas (Viaflo®) conservadas a temperatura ambiente (25 °C) y en nevera (4 °C). Las concentraciones teóricas finales de las mezclas intravenosas de busulfán fueron de 0,24 y 0,12 mg/ml, respectivamente.

Se tomaron muestras de 1 ml de cada una de las bolsas a 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 h. Tras su obtención estas muestras se diluyeron con suero fisiológico (1:40) y congelaron a -40 °C hasta su análisis. Una vez descongeladas se procesaron por triplicado, como se ha descrito para las diluciones patrón.

Se estableció que el proceso de degradación del busulfán corresponde a una cinética de orden 1. De forma que para establecer la estabilidad se determinó el t_{90} mediante regresión semilogarítmica del porcentaje de concentración remanente de busulfán frente al tiempo. Siguiendo las recomendaciones de las diferentes agencias internacionales^{11,12}, se determinó el t_{90} de cada ensayo como el límite inferior del intervalo de confianza (IC) del 95%, de forma que puede afirmarse que a tiempo t_{90} la concentración remanente de busulfán es > 90%. Este cálculo lo efectúa el programa informático Sigma Plot®.

RESULTADOS

Técnica analítica

En la figura 1 se muestran los cromatogramas pertenecientes a la concentración más elevada (25 µg/ml), la más baja (0,78 µg/ml) y la muestra sin busulfán (blanco) de la recta de calibración. El tiempo de retención del producto resultante del proceso de derivatización es de 8,5 min. En la figura 1 se aprecia que no hay interferencias para el tiempo de retención del busulfán.

La linealidad se determina a partir de la relación entre las concentraciones y las áreas del cromatograma del modelo y se caracteriza por una recta de regresión de ordenada en el origen -82.938 (IC del 95%, -112.456 a -53.419) y pendiente 141.618.772 (IC del 95%, 193.113.724-144.123.821) y cuyo coeficiente de determinación fue > 0,999 en el ámbito de las concentraciones ensayadas. El error relativo y el CV fueron inferiores al 10%.

La sensibilidad del método fue de 0,635 µg/ml, el límite de detección de 1,836 µg/ml y el límite de cuantificación de 6,119 µg/ml.

Estabilidad química

En la tabla 1 se muestran los porcentajes medios de busulfán remanentes en las mezclas intravenosas conservadas a temperatura ambiente y en nevera a distintos tiempos de muestreo. En todas las condiciones ensayadas, el porcentaje de concentración remanente de busulfán a las 24 h fue < 90%.

En la figura 2 se muestran las curvas de degradación del busulfán a las distintas temperaturas y condiciones de conservación, así como sus parámetros de regresión y su t_{90} . A 25 °C y concen-

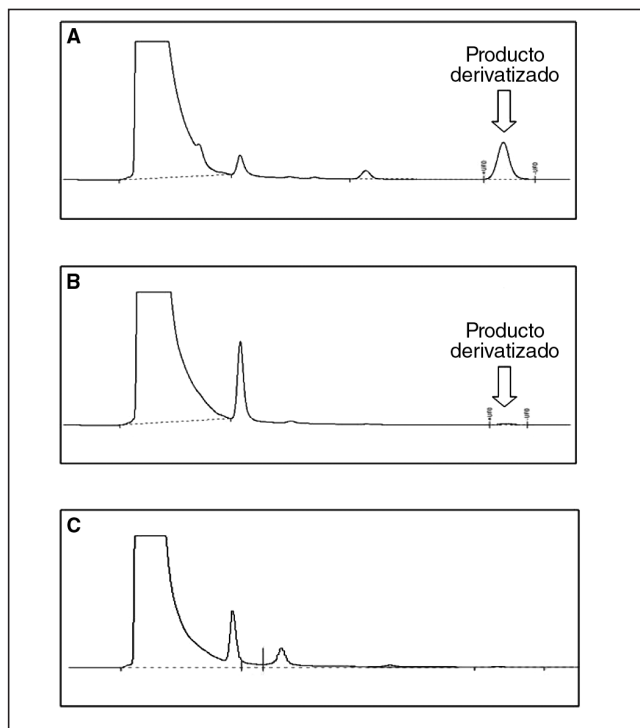


Fig. 1. Cromatogramas correspondientes a la concentración de 25 µg/ml (A) y 0,78 µg/ml (B) de busulfán, y la muestra blanco sin busulfán (C).

tración de 0,24 mg/ml el t_{90} fue de 8,4 h; a 4 °C y concentración de 0,24 mg/ml fue de 16,7 h; a 25 °C y concentración de 0,12 mg/ml fue de 12 h, y a 4 °C y 0,12 mg/ml fue de 11,5 h.

DISCUSIÓN

La técnica analítica utilizada para la determinación de busulfán permite separar adecuadamente el pico del producto resultante del proceso de derivatización de las impurezas de la muestra y presenta una adecuada estabilidad, exactitud y precisión.

En el presente estudio se ha determinado la estabilidad del busulfán en mezclas intravenosas en bolsas de poliolefinas a 2 concentraciones, 0,24 y 0,12 mg/ml, almacenadas en nevera y a temperatura ambiente.

Las concentraciones remanentes de busulfán fueron, durante las 24 h del estudio, superiores a los límites de cuantificación de la técnica analítica asegurando así la validez de las concentraciones obtenidas.

Las bolsas de concentración de 0,24 y 0,12 mg/ml conservadas a temperatura ambiente durante 24 h pierden un 10% de su concentración (t_{90}) a las 8,4 y 12,3 h, respectivamente; valores que coinciden con lo publicado en la bibliografía con relación a la estabilidad del busulfán^{3,7}. Por otra parte, las bolsas conservadas en nevera a 4 °C, durante 24 h, pierden un 10% de su concentración (t_{90}) a las 16,7 h la de 0,24 mg/ml, y 11,5 h la de 0,12 mg/ml.

Tabla 1. Porcentajes medios remanentes (%) de las mezclas intravenosas de busulfán conservadas a temperatura ambiente y en nevera a distintos tiempos de muestreo (n = 3)

Tiempo (h)	Busulfán (0,24 mg/ml)				Busulfán (0,12 mg/ml)			
	25 °C		4 °C		25 °C		4 °C	
	Media (%)	DE (%)	Media (%)	DE (%)	Media (%)	DE (%)	Media (%)	DE (%)
1	100,4	0,078	100	2,131	100	2,761	100	1,27
2	99,1	2,768	99,1	0,365	101,7	1,913	98,3	0
4	97,8	0,908	98,3	2,141	97,4	2,061	94,1	4,565
6	93,6	0,55	94,1	2,453	98,2	3,268	95	5,726
8	89,8	1,139	94,5	0,801	93,1	0,217	97,5	4,557
10	87,7	3,338	94,1	0,766	93,1	3,463	89,1	5,97
12	85,2	1,89	95,3	1,794	90,5	2,215	90,8	9,32
24	75,5	3,643	88,2	2,173	80,3	2,054	85	1,155

DE: desviación estándar.

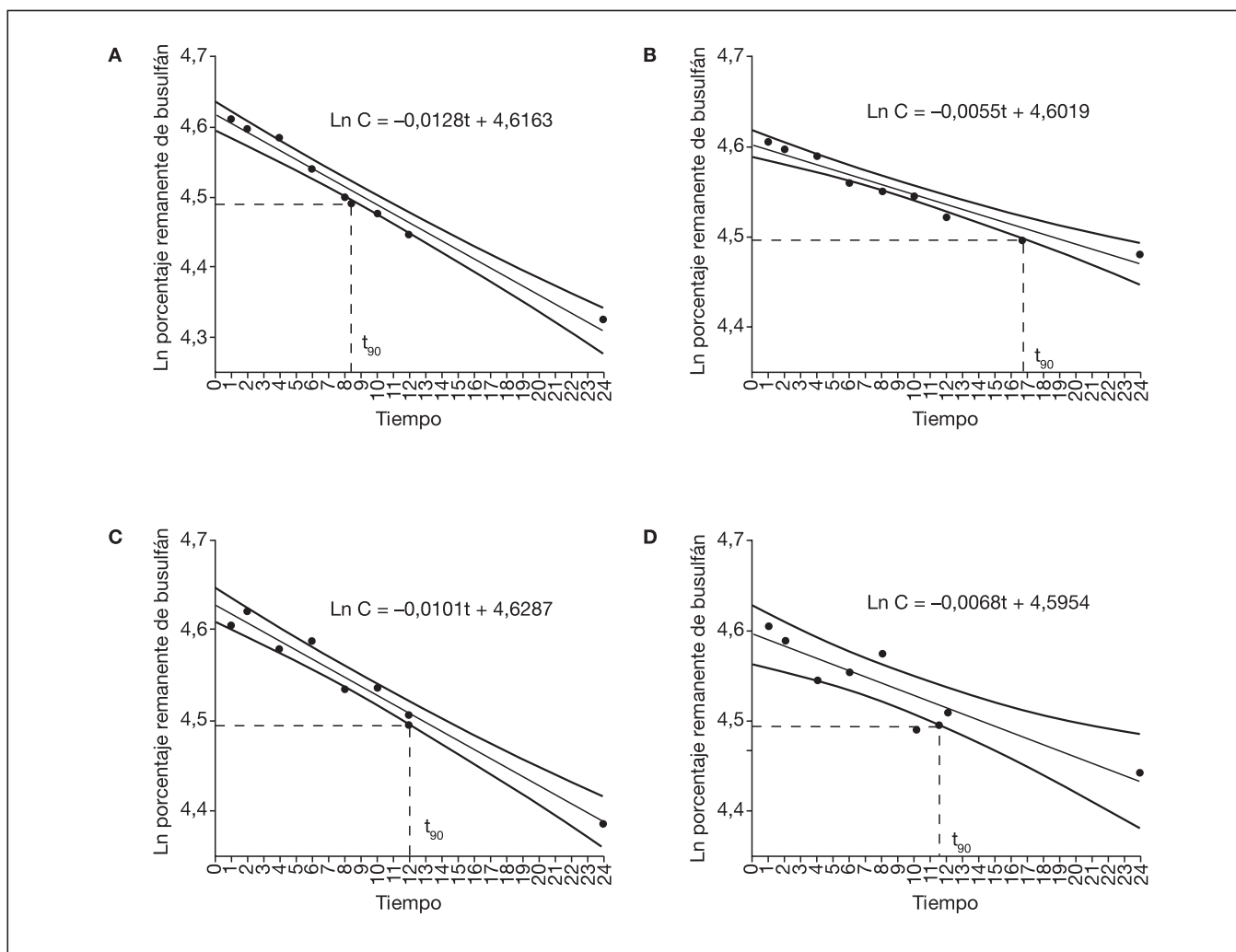


Fig. 2. Recta de regresión e intervalo de confianza (IC) del logaritmo neperiano (Ln) del porcentaje remanente de busulfán frente al tiempo, para diferentes concentraciones y condiciones de conservación. A) t_{90} 25 °C 0,24 mg/ml; B) t_{90} 4 °C 0,24 mg/ml; C) t_{90} 25 °C 0,12 mg/ml; D) t_{90} 25 °C 0,12 mg/ml.

Estos datos obtenidos concuerdan con las instrucciones del fabricante en la ficha técnica³ y tratados de estabilidad de prestigio⁷. Sin embargo, parecen alejarse de los presentados en el artículo publicado por Karstens y Krämer¹³, donde se defiende una estabilidad mucho mayor, de hasta 48 h, en soluciones de 0,5 mg/ml en suero fisiológico conservadas a 13-15 °C. No obstante, debe señalarse que en este trabajo se calcula el t_{90} interpolando directamente en la recta de regresión y no en la recta que marca el límite inferior del IC del 95%. Esta misma limitación se aprecia en el artículo publicado por Gaisford et al¹⁴, que obtiene una estabilidad para una ampolla de busulfán diluida en 50 ml de fisiológico de 27 h entre 24 y 6 °C más 3 h a 25 °C.

En resumen, el presente estudio demuestra que el busulfán a una concentración de 0,24 mg/ml en suero fisiológico será estable en las bolsas ensayadas durante un período de almacenamiento de 12 h en nevera más las 2 h de administración del fármaco.

Bibliografía

1. Real Farmacopea Española. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo; 1997.
2. Base de datos del medicamento del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España (BOT). Madrid: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos; 2006.
3. Busilvex® 60 mg/ml. Ficha técnica. Pierre Fabre Medicament Production; 2003.
4. Busulfan Allen® 2 mg. Ficha técnica. Allen Farmaceutica, S.A.; 2004.
5. Fernández-Rañada JM, editor. Terapia en oncohematología. Madrid: IM&C; 1993.
6. USP 30, NF 25 United States Pharmacopeia. Rockville MD, USA; 2006.
7. Catania PN, editor. King Guide to parenteral admixtures. California: King Guide Publications, Inc.; 2003.
8. Henner WD, Furlong EA, Flatherty MD, Shea TC. Measurement of busulfan in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1987;416:426-32.
9. Karnes HT, March C. Precision, accuracy, and data acceptance criteria in biopharmaceutical analysis. *Pharm Res.* 1993;10:1420-6.
10. Shah VP, Midha KK, Dighe S, McGilveray LJ, Skelly JP, Yacobi A, et al. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *J Pharm Sci.* 1992;81:309-12.
11. Center for Drugs and Biologics Food and Drug Administration Department of Health and Human Services. Guideline for submitting documentation for the stability of human drugs and biologics.; 1987 [citado, 24 Jul 2008]. Disponible en: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/05d0047/05d-0047-bkg0001-Tab-08.pdf>
12. European medicines Agency Inspections. Guideline on stability testing: stability testing of existing active substances and related finished products; 2003 [citado 24 Jul 2008]. Disponible en: <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/qwp/012202en.pdf>.
13. Karstens A, Krämer I. Chemical and physical stability of diluted busulfan infusion solutions. *EJHP.* 2007;13:40-70.
14. Gaisford S, O'Neill M, Thompson L, Chan KL. Shelf-life prediction of intravenous busulfan by isothermal calorimetry. *Hospital Pharmacist.* 2006;13:295-8.