

# Caracterización de los parámetros de calidad de piridostigmina sustancia activa, como indicadores para la toma de decisión en su adquisición logística: racionalización de costes

M. Verón Moros<sup>1</sup>, JI. Cabrera Merino<sup>2</sup>, A. Zamanillo Sainz<sup>3</sup>, L. Martín-Albo Montes<sup>2</sup>, ML. Urquía Grande<sup>4</sup>, A. Juberías Sánchez<sup>2</sup>, FJ. Broncano Berenguer<sup>5</sup>

*Sanid. mil. 2008; 64 (3): 154-162*

## RESUMEN

**Introducción:** La utilización de agentes neurotóxicos en situaciones de conflicto bélico o actos terroristas es algo no deseado para lo que hay que estar preparado. Para ello se considero en el ámbito de la OTAN la elección como pretratamiento frente a un posible uso de agentes neurotóxicos del bromuro de piridostigmina. **Lugar de realización:** Centro Militar de Farmacia de la Defensa. **Objetivo:** Esta sustancia activa se puede adquirir a distintos proveedores, con la particularidad de que entre ellos existe una enorme discrepancia en cuanto al precio de adquisición. Para despejar las dudas sobre este aspecto económico se realiza una caracterización de los parámetros de calidad de esta sustancia activa, entre los que se encuentra la detección de sus impurezas, A y B, así como sustancias relacionadas de la misma mediante la sofisticada técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC – High Performance Liquid Chromatography). Todo ello encaminado a la toma de decisión en su adquisición logística y racionalizar los costes. **Conclusiones:** A la vista de los resultados obtenidos la calidad del bromuro de piridostigmina de las muestras analizadas es aceptable en todas ellas, ya que los niveles de impurezas y sustancias relacionadas están dentro de los niveles que marca la Real Farmacopea Española en su última edición, así como la Farmacopea Europea. La decisión de su adquisición debería recaer en la más económica. Se desconocen las circunstancias que provocan que en el mercado farmacéutico exista esta enorme discrepancia económica en lo referente al precio final de la sustancia activa. Al menos en nuestro terreno, tenemos la seguridad de que la calidad del bromuro de piridostigmina adquirido está dentro de los límites de la calidad exigida.

**PALABRAS CLAVE:** Piridostigmina, agentes neurotóxicos, cromatografía líquida de alta resolución, costes.

## INTRODUCCIÓN

Una de las situaciones más importantes en el caso de conflicto bélico con armas químicas o atentados terroristas es la utilización de agentes neurotóxicos, conocidos clásicamente como «gases de guerra» o «gases nerviosos». Los agentes neurotóxicos son compuestos organofosforados similares a los insecticidas en cuanto a estructura química, pero con mayor toxicidad. Los más conocidos son el **tabún** o GA (N,N-dimetilfosforamidocianidato de O-etilo), el **sarin** o GB (metilfosfonofluoridato de O-isopropilo), el **ciclosarin** o GF (metilfosfonofluoridato de O-ciclohexilo), el **somán** o GD (metilfosfonofluoridato de O-pinacolilo), y los **agentes V**, como el VX (metilfosfonotiolato de O-etilo y de S-2-diisopropilaminoetilo) y el VG (dimetilamidofosfonofluoridato de O-2-dimetilaminoetilo).

Todos ellos producen una inhibición irreversible sobre la enzima acetilcolinesterasa que fisiológicamente desactiva la acetilcolina en las sinápsis, por lo que en estas situaciones se va a producir un exceso de acetilcolina dándose lugar a una hiperestimulación colinérgica.

El bromuro de piridostigmina actúa inhibiendo la hidrólisis de la acetilcolina al competir con ésta frente al ataque de la acetilcolinesterasa de una manera reversible, produciendo algo parecido al efecto del agente neurotóxico. De esta manera, con la piridostigmina se con-

seguirá un incremento en la persistencia de la acetilcolina endógena que ejercerá sus efectos activadores sobre los receptores muscarínicos y nicotínicos con sus acciones típicas (bradicardia, vasodilatación, aumento del peristaltismo, broncoconstricción, miosis, etc.)<sup>1-5</sup>.

Parece un contrasentido utilizar el bromuro de piridostigmina frente a los agentes neurotóxicos, ya que van a producir efectos parecidos, debido a que su mecanismo de acción es muy similar. Sin embargo, es por eso, que el bromuro de piridostigmina sólo ha de emplearse como pretratamiento ante la posible exposición a los citados agentes y nunca cuando la exposición a los mismos ya exista, porque se pueden, evidentemente, potenciar los efectos tóxicos.

El fundamento es preparar al organismo con una adecuada reserva de acetilcolina ante la posible exposición al gas nervioso.

Recordando la historia reciente, en el año 1991, durante la guerra del golfo, fueron utilizadas armas químicas de este tipo, por lo que el 14 de enero de 1993 en París, se firma la Convención sobre Armas Químicas con los objetivos de: prohibición global del desarrollo, la producción, el almacenamiento y el empleo de armas químicas, con plazos para su destrucción. Posteriormente se crea la Organización para la Prohibición de las Armas Químicas (OPAQ) para desarrollar los objetivos de la Convención y su entrada en vigor<sup>6</sup>.

Sin embargo, con posterioridad ha habido atentados terroristas en los que se ha utilizado alguno de estos gases nerviosos, como son los casos de uso de sarín en Japón, tanto en Matsumoto en 1994, como en el metro de Tokio en 1995, con 12 muertos y 6.000 afectados.

Buscando esta utilidad de la piridostigmina como pretratamiento frente a agentes neurotóxicos, las Fuerzas Armadas, incluyeron

<sup>1</sup> Licenciada en Farmacia. Centro Militar de Farmacia de la Defensa, Madrid.

<sup>2</sup> Tcol. Farmacéutico. Centro Militar de Farmacia de la Defensa, Burgos.

<sup>3</sup> Cte. Farmacéutico Allied Land Component Command Hq, Madrid.

<sup>4</sup> Doctora en Farmacia. Centro Militar de Farmacia de la Defensa, Madrid.

<sup>5</sup> Tcol. Farmacéutico. Centro Militar de Farmacia de la Defensa, Madrid.

**Dirección para correspondencia:** M. Verón Moros. Centro Militar de Farmacia de la Defensa. Embajadores, 75. 28012 Madrid.

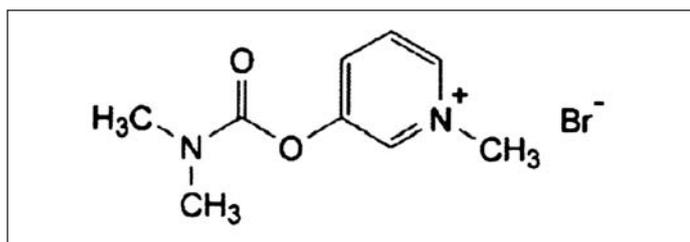


Figura 1. Bromuro de Piridostigmina.

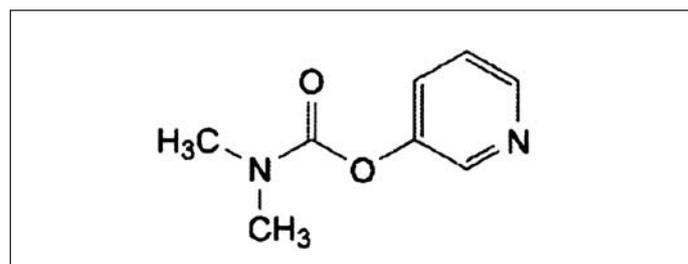


Figura 2. Dimetilcarbamato de piridin-3-ilo.

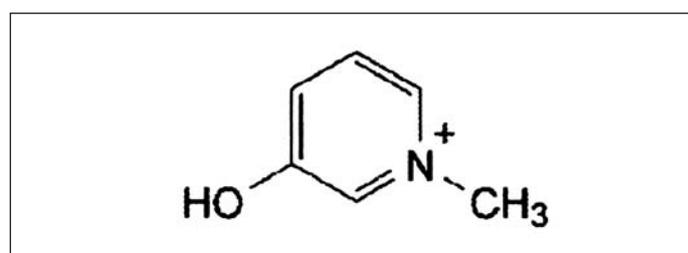


Figura 3. 3-hidroxi-1-metilpiridinio.

en el Petitorio de Farmacia Militar del Ministerio de Defensa<sup>7</sup> el elaborado PIRIDOSTIGMINA DEF, que se fabrica bajo forma farmacéutica de comprimidos de 30 mg en las instalaciones del Centro Militar de Farmacia de la Defensa situado en Burgos.

Por supuesto, hay que tener en cuenta que el incremento de la actividad de la acetilcolina provocado por el bromuro de piridostigmina es especialmente importante en el tratamiento de las patologías de la placa neuromuscular, como la miastenia gravis, que es la indicación clásica aceptada para esta sustancia<sup>8,9</sup>. Para esta enfermedad el bromuro de piridostigmina se emplea en dosis más elevadas que cuando es utilizado como pretratamiento frente a agentes neurotóxicos.

De los materiales de partida utilizados en el proceso de producción de dicho elaborado, se constata una enorme discrepancia, en cuanto al precio de adquisición por kilogramo de la sustancia activa (SA, Bromuro de piridostigmina, Figura 1), siendo tan elevada que en algunos casos que puede llegar a multiplicarse por cuatro.

La selección de proveedores y productos se convierte en un factor clave dentro del actual entorno competitivo donde se busca un continuo recorte de costes pero mejorando la calidad y eficiencia.

Tras el estudio de mercado realizado a los proveedores locales, nacionales e internacionales, se plantea la principal dificultad, la estandarización de los parámetros para la selección del producto dentro de unas especificaciones mínimas de calidad requeridas por la actual Real Farmacopea Española<sup>10</sup>.

No vamos a entrar en un análisis económico del precio ni vamos a analizar los factores que influyen en las estrategias de las compañías químicas de suministro de SA, en su definición de precios conceptos de rentabilidad etc., pero si analizar, comprender y estudiar la gestión de compras desde un punto de vista técnico con una estrategia de calidad, y que esta decisión esté soportada por unos parámetros técnicos de calidad mejorados sobre los ya existentes.

Para ello, por una parte se estandarizan y se cuantifican los parámetros de calidad que se consideran relevantes, y por otra se desarrolla y se pone a punto una técnica de evaluación cuantitativa muy sofisticada como es la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) a través de la cual podremos observar si existe alguna variación significativa en la calidad de las SA analizadas, ya sea por su potencia o por la existencia de sustancias relacionadas e impurezas.

## OBJETIVO

Ante la enorme discrepancia en cuanto al precio de adquisición del bromuro de piridostigmina en distintos proveedores, se plantea la posibilidad de intentar asociar esa discrepancia, a la existencia de más o menos impurezas en la sustancia activa, mencionadas como

impurezas A y B (dimetilcarbamato de piridin-3-ilo y 3-hidroxi-1-metilpiridinio respectivamente – Figuras 2 y 3), y a la riqueza de la SA, comprobando que el resto de los parámetros de calidad cumplan las especificaciones requeridas y propuestas.

## MATERIAL Y METODOS

### 1. Muestras de sustancias activas

De las SA existentes en el mercado internacional, se someten al estudio tres muestras de bromuro de piridostigmina de diferentes proveedores, con el precio más alto, el precio menor y un precio intermedio. Se muestran en la siguiente tabla, los precios y procedencia de la sustancia activa (tabla I).

### 2. Estándares

Se utilizan estándares de Farmacopea Europea<sup>10</sup>:

- Bromuro de Piridostigmina Lote: n.º 2.
- Dimetilcarbamato de piridin-3-ilo (impureza A) Lote: n.º 1a.
- 3-hidroxi-1-metilpiridinio (impureza B) Lote: 429.02.07.01

### 3. Métodos analíticos utilizados en las determinaciones

- Identificación por espectrofotometría de absorción en infrarrojo.
- Riqueza de la SA.

Tabla I. Descripción de las muestras

	Proveedor 1	Proveedor 2	Proveedor 3
<b>Precio</b>	494,00 €/ Kg	145,60 €/ Kg	375,00 €/ Kg
<b>Procedencia</b>	Italia	China	China

- Contenido en agua.
- Sustancias relacionadas.
- Impurezas.

La **identificación** de las SA se realiza por **espectrofotometría de absorción en infrarrojo**, se determina según indica la Real Farmacopea Española<sup>10</sup> y consiste en comparar el espectro obtenido con gráfica patrón del estándar de bromuro de piridostigmina para verificar su identidad, utilizando el espectrofotómetro de infrarrojos (NICOLET IR 200. FT-IR.). Condiciones: 400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>.

La **riqueza** de las SA se analiza por  **cromatografía líquida de alta resolución** (HPLC), consiste en inyectar las muestras problemáticas frente a un estándar y comparando los cromatogramas obtenidos determinamos la riqueza de las muestras. El cromatógrafo utilizado es un HP Agilent Mod. 1100 compuesto por bomba cuaternaria, inyector automático, detector de diodos y software Chem-Station con algoritmo de integración mejorado para tratamiento de datos. La columna es una C-18 desactivada para bases (Eclipse Plus 4,6 × 150 mm 5 μm). Se optimizaron los parámetros cromatográficos para escoger las mejores condiciones de fase móvil, flujo, volumen de inyección, longitud de onda y parámetros de integración. Por ser un método que no está descrito en la Real Farmacopea Española se realiza un desarrollo analítico<sup>11,12</sup> del mismo y se procede a su validación.

El **contenido en agua** de las muestras de SA se analiza por **perdida por desecación**, el ensayo se realiza según indica la Real Farmacopea Española<sup>10</sup> y consiste en determinar la cantidad de agua que se pierde en un gramo de sustancia activa que se introduce en una estufa de desecación a 100-105°C hasta peso constante.

Las **sustancias relacionadas** para el bromuro de piridostigmina se determinan según indica la Real Farmacopea Española<sup>10</sup> y se utiliza la técnica de  **cromatografía líquida de alta resolución** (HPLC) y consiste en comparar las áreas de los picos del cromatograma obtenido con la disolución de referencia y con la disolución problema. El cromatógrafo utilizado es un HP Agilent Mod. 1100 compuesto por bomba cuaternaria, inyector automático, detector de diodos y software Chem-Station con algoritmo de integración mejorado para tratamiento de datos.

El contenido en **impurezas** de las muestras a analizar se determinan mediante  **cromatografía líquida de alta resolución** (HPLC) consiste en inyectar las muestras problemáticas frente a un estándar de impureza A y otro de impureza B, se comparan los cromatogramas obtenidos determinando la cantidad de impurezas presentes en las muestras. Se utiliza el mismo cromatógrafo y las mismas condiciones cromatográficas descritas en el ensayo de riqueza. Por ser un método que no está descrito en la Real Farmacopea Española se realiza un desarrollo analítico del mismo y se procede a su validación.

## DESARROLLO ANALÍTICOS Y VALIDACIÓN DEL ENSAYO DE RIQUEZA Y DEL ENSAYO DE CUANTIFICACIÓN DE IMPUREZAS DEL BROMURO DE PIRIDOSTIGMINA

La técnica utilizada para la cuantificación de la riqueza de la sustancia activa y para la cuantificación de impurezas es mediante HPLC y las condiciones cromatográficas son las mismas en ambos

casos por lo que se puede realizar la determinación en un mismo método analítico.

Los criterios de validación estudiados son los propuestos por la Conferencia Internacional de Armonización Europea<sup>13</sup>. Los parámetros utilizados para la validación del proceso son los siguientes:

- Idoneidad del sistema
- Exactitud
- Precisión intermedia
- Repetibilidad del sistema instrumental
- Repetibilidad del método
- Estabilidad de la muestra
- Linealidad
- Límite de cuantificación

### 1. Idoneidad del sistema

Un cromatógrafo líquido de alta resolución es un conjunto de instrumentos, bomba, inyector, horno, columna, detector e integrador, que están en línea y por el cual fluye una fase móvil difícil de reproducir de unos ensayos a otros. Por otra parte, la columna analítica, aún procedente del mismo fabricante, puede variar en cuanto a su resolución de unos lotes a otros, e incluso puede variar de un día para otro, al saturarse por excipientes no eluidos, o por el trato recibido durante los análisis (presión muy alta, que produce compactaciones, cambios bruscos de temperatura, creación de canales preferenciales de elución, etc.).

Todas estas variables en el conjunto del cromatograma hace difícil la cualificación de funcionamiento del cromatógrafo. Para solucionar este problema y dado que siempre se cromatografía un estándar de referencia en las mismas condiciones que el problema a valorar, se fijan en el método analítico, una serie de parámetros cromatográficos antes de comenzar con el análisis de la muestra. Dichos parámetros para determinar la idoneidad del sistema son los siguientes:

#### A) Factor de capacidad (K)

Para este factor que está relacionado con los tiempos de retención del problema en la columna, se fijan un mínimo y a veces un máximo, con lo que se asegura que el binomio eluyente-columna es adecuado. El límite para la sustancia activa debe ser mayor de 2 y para las impurezas, mayor de 1.

#### B) Número de platos teóricos

Con este parámetro, se determina la eficacia de la columna, qué esta en función, tanto del estado en el que se encuentra la misma (calidad y uniformidad del empaquetado), como de la sustancia que está siendo cromatografiada, velocidad del flujo, temperatura, pequeñas diferencias en la fase móvil, etc. El número de platos teóricos debe ser mayor de 2000.

#### C) Factor de resolución

Es una medida de eficacia de separación entre dos componentes de una mezcla. Fijando un valor mínimo para este parámetro se asegura una adecuada cuantificación de los picos para evitar problemas de solapamiento. El factor de resolución entre picos debe ser mayor de 1,5.

C) Factor «Tailing»

Mide el grado de asimetría del pico: Un factor Tailing adecuado evita problemas de integración del aérea del pico. El factor para cada pico debe ser menor de 2.

2. Exactitud

Capacidad del sistema para rendir resultados próximos al verdadero. Es una medida del rigor del método analítico y reflejo de los posibles errores sistemáticos del método. Se expresa como Porcentaje de recuperación o capacidad del método para cuantificar cantidades conocidas de principio activo presentes en el medio, en relación con el valor teórico alcanzable.

Para comprobar la exactitud del método se prepararon cinco diluciones distintas, del estándar de piridostigmina, otras 5 de la impureza A y otras 5 de la impureza B, calculándose los tantos por ciento de recuperación medios de cada uno.

3. Precisión intermedia

Determina la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la muestra, en un mismo laboratorio pero en condiciones operativas diferentes. Se propone un estudio matricial con tres muestras que se inyectan por triplicado, tres días, dos analistas y dos instrumentos de la misma marca y modelo. Cada muestra porta la concentración teórica correspondiente de sustancia activa del 100% y la cantidad de impurezas A y B cuya concentración es de 2 ppm.

4. Repetibilidad del sistema instrumental

Estudia la variabilidad debida al instrumento, y se determina efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra de forma consecutiva. Se realizan diez inyecciones de una muestra cuya concentración teórica correspondiente de sustancia activa es del 100% y la cantidad de impurezas A y B es de 2 ppm.

5. Repetibilidad del método

Grado de precisión entre los resultados individuales del ensayo, realizado repetidamente sobre una muestra homogénea. Cada resultado individual procede de un análisis completo. Se demuestra con lecturas consecutivas de distintas muestras, preparadas en el mismo día desde un principio, por el mismo instrumento y analista. Se realizan seis muestras que se inyectan por triplicado con una concentración teórica de 100% de la SA y de 2 ppm de cada una de las impurezas.

6. Estabilidad de la muestra

Determinación del tiempo durante el cual la solución de referencia permanece estable y sigue siendo válida. Este tiempo se puede extrapolar a la estabilidad de las muestras problema. Una muestra cuya concentración teórica correspondiente de sustancia

activa es del 100% y la cantidad de impurezas A y B es de 2 ppm. Se inyecta por triplicado, durante dos días consecutivos que son los que necesitaríamos si programásemos una secuencia, de tal forma que pudiésemos asegurar la estabilidad de la muestra una vez preparada hasta el momento de su inyección.

7. Linealidad

Capacidad del método para dar resultados directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra dentro de un rango establecido. Se expresa en términos de variación alrededor de la pendiente y ordenada de la línea de regresión lineal, calculada de acuerdo a una relación matemática. Para comprobar la linealidad del método se preparan tres rectas de calibrado, una para la sustancia activa y otras para las impurezas A y B con las siguientes concentraciones:

- Recta sustancia activa 0.024, 0.032, 0.040, 0.048, 0.056 mg/ml
- Recta impureza A 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8 ppm
- Recta impureza B 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8 ppm

8. Limite de cuantificación

El límite de cuantificación es la cantidad mínima de impurezas que puede ser cuantificable bajo unos parámetros óptimos. Para su determinación se calcula a partir de las rectas de calibrado mediante la siguiente expresión:

$$LC = 10 \cdot s/b$$

Donde *s* representa la desviación estándar de la ordenada en el origen y *b* la pendiente de la recta de calibrado.

RESULTADOS

Los resultados de la validación de la técnica analítica para la cuantificación de la riqueza y de las impurezas del bromuro de piridostigmina, se recogen y distribuyen de la siguiente forma:

Los resultados obtenidos en los parámetros estudiados para ver la **Idoneidad del sistema** se recogen en la tabla II.

Tabla II. Resultados del test de idoneidad del sistema

	Factor de capacidad	N.º de platos teóricos	Factor de resolución	Factor Tailing
Piridostigmina	7,72	527.921	20,3	1,7
Impureza A	9,053	56.102	13,5	0,8
Impureza B	13,14	58.112	8,2	0,9

Tabla III. Exactitud

	Recuperación Media (%)	CV (%)	Diferencia (%)	t <sub>exp</sub>	T <sub>Tablas</sub> (P=0,05 GI=4)
Piridostigmina	99,60	0,16	0,40	1,115	2,571
Impureza A	99,09	0,28	0,91	1,457	2,571
Impureza B	99,13	0,20	0,87	1,956	2,571

**Tabla IVa.** *Precisión intermedia Piridostigmina Bromuro*

Día n.º	INSTRUMENTO N.º 1 MEDIDA (mAU)		INSTRUMENTO N.º 2 MEDIDA (mAU)	
	Analista n.º 1	Analista n.º 2	Analista n.º 1	Analista n.º 2
1	12,156	12,134	12,181	12,206
2	12,117	12,192	12,201	12,170
3	12,178	12,214	12,214	12,180
MEDIA	12,150	12,180	12,199	12,185
DESV. ESTAN.	0,031	0,041	0,017	0,019
COEF. VARIA.	<b>0,254</b>	<b>0,339</b>	<b>0,136</b>	<b>0,153</b>
C.V% PRECISIÓN INTERMEDIA				<b>0,882</b>

**Tabla IVc.** *Precisión intermedia Impureza B*

Día n.º	INSTRUMENTO N.º 1 MEDIDA (mAU)		INSTRUMENTO N.º 2 MEDIDA (mAU)	
	Analista n.º 1	Analista n.º 2	Analista n.º 1	Analista n.º 2
1	2,392	2,401	2,521	2,361
2	2,410	2,301	2,500	2,396
3	2,471	2,345	2,567	2,378
MEDIA	2,424	2,349	2,529	2,378
DESV. ESTAN.	0,041	0,050	0,034	0,018
COEF. VARIA.	<b>1,708</b>	<b>2,134</b>	<b>1,355</b>	<b>0,736</b>
C.V% PRECISIÓN INTERMEDIA				<b>5,921</b>

**Tabla IVb.** *Precisión intermedia Impureza A*

Día n.º	INSTRUMENTO N.º 1 MEDIDA (mAU)		INSTRUMENTO N.º 2 MEDIDA (mAU)	
	Analista n.º 1	Analista n.º 2	Analista n.º 1	Analista n.º 2
1	5,512	5,987	5,675	5,784
2	5,214	5,891	5,612	5,701
3	5,456	5,874	5,698	5,733
MEDIA	5,394	5,917	5,662	5,739
DESV. ESTAN.	0,158	0,061	0,045	0,042
COEF. VARIA.	<b>2,936</b>	<b>1,030</b>	<b>0,786</b>	<b>0,729</b>
C.V% PRECISIÓN INTERMEDIA				<b>5,384</b>

**Tabla V.** *Coefficientes máximos*

PORCENTAJE DE ANALITO EN LA MUESTRA	KOLTHOFF CV (%) MÁXIMO	HORWITZ CV (%)
100	0,1-0,3	2
50	0,3	2,2
10	1,0	2,8
1	2,0-5,0	4,0
0,1	5,0-10,0	5,7
0,01-0,001	10,0	8,0-11,3
0,0001	—	16,0

una  $t_{exp} < t_{tab}$  no existiendo una diferencia significativa entre la recuperación media y el 100%, confirmando una buena exactitud del método.

Los resultados de **precisión intermedia** se recogen en la tabla IV. Para determinar los valores máximos aceptables de los coeficientes de variación en tanto por ciento (CV%) se aplican los coeficientes de Kolthoff y Horwitz (tabla V) donde se establecen dife-

Los porcentajes de recuperación de los analitos para determinar la **exactitud** del método se recogen en la tabla III. A los resultados obtenidos se les aplica el test de t-Student observando en todos los casos

**Tabla VI.** *Repetibilidad del sistema instrumental*

N.º DE DATOS	PIRIDOSTIGMINA		IMPUREZA A		IMPUREZA B	
	Y (mAU)	$(Y - \bar{Y})^2$	Y (mAU)	$(Y - \bar{Y})^2$	Y (mAU)	$(Y - \bar{Y})^2$
1	1219,500	0,073	5,789	0,013	2,470	0,003
2	1219,300	0,221	5,685	0,000	2,409	0,000
3	1219,800	0,001	5,624	0,002	2,399	0,000
4	1219,800	0,001	5,717	0,002	2,381	0,001
5	1220,100	0,109	5,602	0,005	2,417	0,000
6	1220,200	0,185	5,736	0,004	2,422	0,000
7	1219,900	0,017	5,693	0,000	2,406	0,000
8	1219,700	0,005	5,599	0,006	2,394	0,000
9	1220,000	0,053	5,589	0,007	2,463	0,002
10	1219,400	0,137	5,704	0,001	2,392	0,001
SUMA	12197,700	0,801	56,738	0,041	24,153	0,008
MEDIA	1219,770	0,080	5,674	0,004	2,415	0,001
DESV. ESTAN.	0,298	0,089	0,067	0,005	0,030	0,001
COEF. VARIA.	0,024	<b>0,007</b>	1,187	<b>0,080</b>	1,225	<b>0,036</b>
C.V MAXIMO	(INTERVALO)	0,870		0,870		0,870
C.V MAXIMO	(HORWITZ)	2,000		1,802		1,802
<b>TEST DE F</b>						
F CALCULA		0,004		0,044		0,020
F TABULAD	P=0,05/ 5GL/ 95%	4,387		4,387		4,387

**Tabla VII.** Repetibilidad del método

N.º DE DATOS	PIRIDOSTIGMINA		IMPUREZA A		IMPUREZA B	
	Y (mAU)	$(Y - \bar{Y})^2$	Y (mAU)	$(Y - \bar{Y})^2$	Y (mAU)	$(Y - \bar{Y})^2$
1	1220,500	8,507	5,487	0,017	2,354	0,020
2	1219,300	2,947	5,802	0,034	2,526	0,001
3	1213,800	14,314	5,621	0,000	2,629	0,018
4	1217,100	0,234	5,501	0,014	2,624	0,017
5	1218,100	0,267	5,398	0,049	2,540	0,002
6	1216,700	0,780	5,901	0,080	2,289	0,042
SUMA	7305,500	27,048	33,710	0,193	14,962	0,100
MEDIA	1217,583	4,508	5,618	0,032	2,494	0,017
DESV.ESTAN.	2,326	5,410	0,197	0,039	0,141	0,020
COEF.VARIA.	0,191	<b>0,444</b>	3,499	<b>0,688</b>	5,668	<b>0,801</b>
C.V MAXIMO	(INTERVALO)	0,870		0,870		0,870
C.V MAXIMO	(HORWITZ)	1,623		1,802		1,802
<b>TEST DE F</b>						
<b>F CALCULA</b>		0,274		0,382		0,445
<b>F TABULAD</b>	P=0,05/ 5GL/ 95%	4,387		4,387		4,387

**Tabla VIII.** Estabilidad de la muestra

PIRIDOSTIGMINA		IMPUREZA A		IMPUREZA B	
TIEMPO (horas)	Y (mAU)	TIEMPO (horas)	Y (mAU)	TIEMPO (horas)	Y (mAU)
0	1220,500	0	5,901	0	2,654
6	1218,520	12	5,842	12	2,558
12	1214,940	24	5,801	24	2,540
24	1214,250	36	5,661	36	2,512
36	1213,690	48	5,733	48	2,487
48	1213,870	60	5,701	60	2,498
SUMA	7295,770	SUMA	34,639	SUMA	15,249
MEDIA	1042,253	MEDIA	4,948	MEDIA	2,178
DESV.ESTAN.	2,851	DESV.ESTAN.	0,091	DESV.ESTAN.	0,061
COEF.VARIA.	0,274	COEF.VARIA.	1,836	COEF.VARIA.	2,805

**Tabla IX.** Linealidad

COMPONENTE	ECUACIÓN DE LA RECTA	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	RESIDUAL Std.Dev
PIRIDOSTIGMINA	$y=1,14720.x+2,85879$	0,99185	0,53801
IMPUREZA A	$y=2,51635.x+4,51547$	0,99963	0,08677
IMPUREZA B	$y=1,55576.x-1,30631$	0,99984	0,01585

rentes coeficientes en función del porcentaje del analito. Los resultados cumplen con los criterios establecidos.

Los datos de la **repetibilidad** del sistema instrumental se muestran en la tabla VI. Se aplica el test de F-Snedecor para ver la variabilidad de esta serie de datos comparándose la F experimental que es menor que la tabulada.

La **repetibilidad del método** se estudia con los datos obtenidos en la tabla VII. Igualmente se aplica el test de F-Snedecor siendo la F experimental menor que la tabulada.

Los datos de **estabilidad de la muestra** se recogen en la tabla VIII.

La **linealidad del método** se estudia basándonos en las rectas de regresión correspondientes a cada uno de los componentes. Los resultados se calculan por mínimos cuadrados obteniendo la ecuación

**Tabla X.** Limite de cuantificación

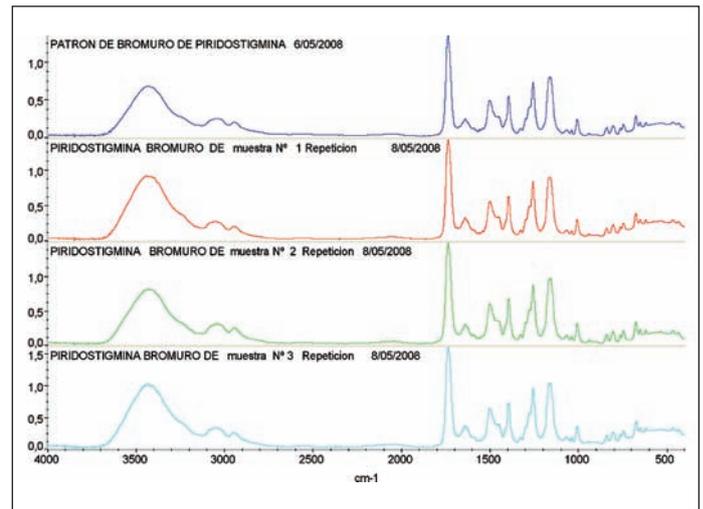
COMPONENTE	LIMITE DE CUANTIFICACIÓN
IMPUREZA A	0,0192 ppm
IMPUREZA B	0,0121ppm

**Tabla XI.** Resultados

	IR	CONTENIDO EN AGUA (%)	SUSTANCIAS RELACIONADA
<b>PROVEEDOR 1</b>	CUMPLE	0.2	CUMPLE
<b>PROVEEDOR 2</b>	CUMPLE	0.2	CUMPLE
<b>PROVEEDOR 3</b>	CUMPLE	0.1	CUMPLE

**Tabla XIIa.** Resultados Impureza B

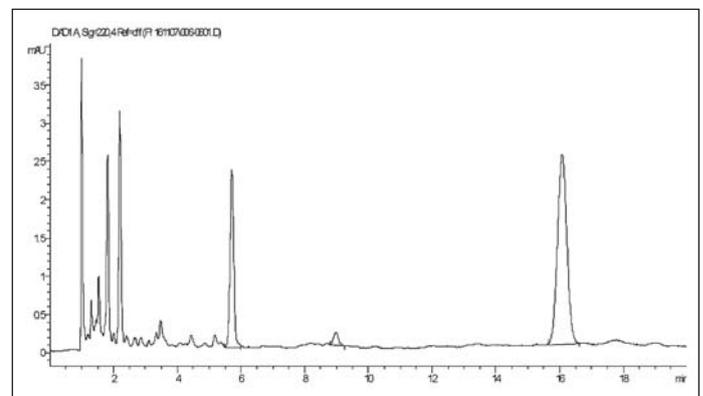
Inyecc. N.º	Proveedor n.º 1 Area (mAU)	Proveedor n.º 2 Area (mAU)	Proveedor n.º 3 Area (mAU)
1	1,3453	1,2949	1,0596
2	1,3467	1,2957	1,0587
3	1,3498	1,2987	1,0555
4	1,3502	1,2898	1,0598
5	1,3501	1,2987	1,0514
6	1,3489	1,2876	1,0563
7	1,3499	1,2989	1,0561
8	1,3500	1,2874	1,0588
9	1,3504	1,2902	1,0542
10	1,3499	1,2906	1,0578
11	1,3500	1,2879	1,0579
12	1,3488	1,2945	1,0574
13	1,3489	1,2902	1,0514
14	1,3501	1,2954	1,0586
15	1,3500	1,2962	1,0598
PROMEDIO	<b>1,3493</b>	<b>1,2931</b>	<b>1,0569</b>
DESVEST	0,001	0,004	0,003
CV	0,106	0,325	0,261



**Figura 4.** Espectros obtenidos por espectrofotometría infrarroja del patrón y muestras de sustancia activa.

**Tabla XIIb.** Resultados Riqueza

Inyecc. N.º	Proveedor n.º 1 Area (mAU)	Proveedor n.º 2 Area (mAU)	Proveedor n.º 3 Area (mAU)
1	1141,0000	1149,0010	1160,5010
2	1141,2350	1149,6250	1160,4120
3	1141,6980	1149,6320	1159,9270
4	1140,9980	1149,2350	1160,0120
5	1140,6970	1148,9890	1160,0020
6	1141,0250	1148,7840	1160,0310
7	1140,9650	1149,3250	1160,2100
8	1140,8990	1149,5420	1159,9470
9	1141,3520	1149,8740	1160,3210
10	1141,7890	1149,7430	1159,7890
11	1141,9650	1148,8990	1159,8760
12	1141,9980	1149,4250	1159,9010
13	1141,6870	1149,2140	1159,8990
14	1141,6320	1148,9120	1159,9280
15	1141,6870	1149,9910	1159,8790
PROMEDIO	<b>1141,375</b>	<b>1149,346</b>	<b>1160</b>
DESVEST	0,427	0,381	0,215
CV	0,037	0,033	0,019



**Figura 5.** Cromatograma de Bromuro de Piridostigmina obtenido por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

de la recta y el coeficiente de correlación que se muestran en la tabla IX.

El **límite de cuantificación** de cada analito se muestra en la tabla X.

Los resultados de las **muestras** de los tres proveedores ensayadas en cuanto a identidad, contenido en agua, sustancias relacionadas se muestran en la tabla XI y los datos de riqueza e impurezas se recogen en la tabla XII y sus espectros de IR así como sus cromatogramas se muestran en las figuras 4 y 5.

Se realiza un tratamiento estadístico mediante el programa informático SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) de los resultados, para comprobar si existe alguna variación significativa en alguna de las tres muestras en cuanto a riqueza o contenido en impurezas. Se realiza un análisis de variancia y la prueba Fisher para comparaciones múltiples con la corrección de Bonferroni, mediante el programa estadístico SPSS.15, tabla XIII.

Se demuestra que el tipo de proveedor afecta significativamente ( $p < 0,05$ ) a la riqueza y la impureza. Con la comparación múltiple se demuestra que existen igualmente diferencias significativamente entre los tres proveedores, figura 6 de diagrama de cajas de distribución.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

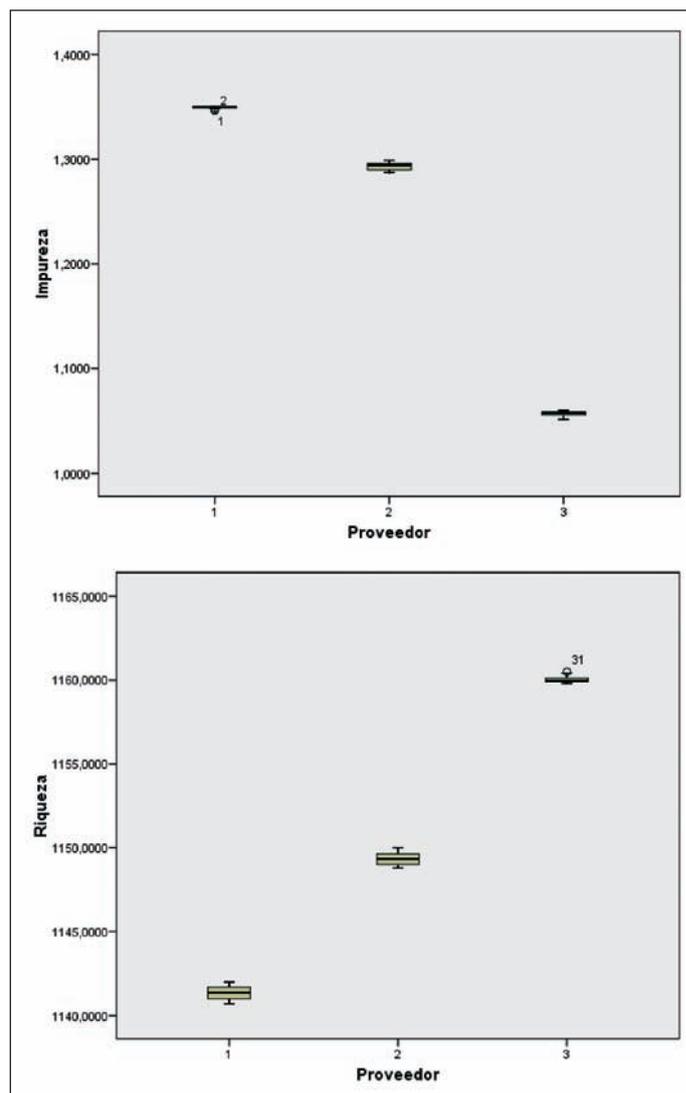
Con los datos de validación podemos considerar que el método desarrollado es adecuado para la cuantificación de la riqueza de la sustancia activa a si como para la cuantificación de sus impurezas.

A la vista de los resultados obtenidos es más que evidente que la calidad del bromuro de piridostigmina de las muestras analizadas es aceptable en todas ellas, ya que los niveles de impurezas y sustancias relacionadas están dentro de los niveles que marca la Real Farmacopea Española en su última edición, así como la Farmacopea Europea. Por lo tanto, para la toma de decisión en la adquisición de esta sustancia activa, únicamente la diferencia entre las muestras es en el precio y la decisión de su adquisición debería recaer en la más económica.

**Tabla XIII.** Análisis de varianza y comparaciones múltiples

ANOVA					
Impureza					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,722	2	,361	39633,420	,000
Within Groups	,000	42	,000		
<b>Total</b>	<b>,723</b>	<b>44</b>			
Multiple Comparisons					
Dependent Variable: Impureza					
Bonferroni					
(I) Proveedor	(J) Proveedor	Sig.	95% Confidence Interval	Upper Bound	Lower Bound
1	2	,000		,053405	-,058902
	3	,000		,289632	-,295128
2	1	,000		-,058902	-,053405
	3	,000		,233478	-,238975
3	1	,000		-,295128	-,289632
	2	,000		-,233478	-,238975
ANOVA					
Riqueza					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2632,051	2	1316,026	10548,720	,000
Within Groups	5,240	42	,125		
<b>Total</b>	<b>2637,291</b>	<b>44</b>			
Multiple Comparisons					
Dependent Variable: Riqueza					
Bonferroni					
(I) Proveedor	(J) Proveedor	Sig.	95% Confidence Interval	Upper Bound	Lower Bound
1	1				
	2	,000		-8,292551	-7,649315
	3	,000		-18,988818	-18,345582
2	1	,000		7,649315	8,292551
	2				
3	3	,000		-11,017885	-10,374649
	1	,000		18,345582	18,988818
	2	,000		10,374649	11,017885
	3				

La utilización de las nuevas tecnologías (Internet) provoca un incremento importante del número de suministradores que están dispuestos a participar al superarse algunas de las tradicionales barreras de entrada a los mercados, obteniéndose así menores precios de compras. La estandarización de los parámetros de ca-



**Figura 6.** Diagrama de cajas de contenido en impurezas y riqueza en sustancia activa.

lidad cobra especial interés para la toma de decisiones y gestión de compras.

Se desconocen las circunstancias que provocan que en el mercado farmacéutico exista esta enorme discrepancia económica en lo referente al precio final de la sustancia activa, pero podría ser motivo de un estudio encaminado a otros aspectos del mercado farmacéutico, como las inversiones en I+D, inclusión de nuevas tecnologías en la empresa, si se es fabricante o solo distribuidor, etc... Tenemos la seguridad de que la calidad del bromuro de piridostigmina adquirido está dentro de los límites de la calidad exigida.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Pita R, Anadón A. y Martínez-Larrañaga MR. Estado actual del pretratamiento de las intoxicaciones por agentes neurotóxicos de guerra con piridostigmina y otras alternativas farmacológicas. *Toxicología* 2003; 20: 1-7.
2. IPCSINTOX Databank. Treatment guides: Síndrome colinérgico. [http://www.intox.org/databank/documents/treat/treats/trt35\\_s.htm](http://www.intox.org/databank/documents/treat/treats/trt35_s.htm)
3. NATO. AMedP-6 (C), Part III Study Draft 3. 220. Pretreatment

4. Marino MT, Schuster BG, Brueckner RP, Lin E, Kaminskis A and Lasseter KG. Population Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Pyridostigmine Bromide for Prophylaxis against Nerve Agents in Humans. *J Clin Pharmacol* 1998; 38: 227-235.
5. Prevención y tratamiento de la intoxicación por gas nervioso (neurotóxico). *The Medical Letter*. Edición española. Vol. XIII N.º 4 (1991): 13-15.
6. Organización para la Prohibición de las Armas Químicas (OPAQ). [www.opcw.org](http://www.opcw.org)
7. Orden Ministerial 53/2004 de 18 de marzo, publicada en el Boletín Oficial de Defensa número 63 de 31 de marzo de 2004.
8. Información de Medicamentos para el profesional sanitario. USP DI 1995 14th Edition. 2ª Edición española. Ministerio de Sanidad y Consumo. Antimiasténicos (Acción sistémica): 402-407.
9. Martindale. Guía completa de consulta farmacoterapéutica. 1.ª Edición. 2003. 1618-1619.
10. Real Farmacopea Española 3ª Edición y Farmacopea Europea 5.ª Edición. 2005. Ministerio de Sanidad y Consumo: 2462-2463.
11. Abu-Qare AW, Abou-Donia MB. A validated HPLC method for the determination of pyridostigmine bromide, acetaminophen, acetylsalicylic acid and caffeine in rat plasma and urine. *J Pharm Biomed Anal.* 2001 Dec; 26 (5-6): 939-47.
12. Abu-Qare AW, Abou-Donia MB. Development of a high-performance liquid chromatographic method for the quantification of chlorpyrifos, pyridostigmine bromide, N,N-diethyl-m-toluamide and their metabolites in rat plasma and urine. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001 Apr 25; 754 (2): 533-8.
13. ICH - Internacional Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for human use. Q2 (R1). «Validation of analytical procedures: Text and Methodology». Noviembre 2005.