

IDENTIFICACION POR CG-EM Y DETERMINACION POR CG DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACION POR TERMOLISIS EN TABLETAS REVESTIDAS DE POLICOSANOL (5 mg)

V. L. González, J. Magraner, L. Cabrera y B. Rivero.

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6880, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 9 de septiembre de 1996.

RESUMEN. Mediante la Cromatografía Gaseosa acoplada a la Espectrometría de Masas se logró identificar al estearato de octacosanilo y al palmitato de octacosanilo como los principales productos de degradación por termólisis de las tabletas revestidas que contienen 5 mg de policosanol. Para la determinación cuantitativa de estos compuestos se desarrolló y validó un método por cromatografía gaseosa, usando columna de relleno y estearato de docosanol como patrón interno. El recobrado del método fue del 99,2 % . Se encontró buena linealidad en el intervalo de relaciones de masa (analito/patrón interno) de 0,33 a 2,61 . La precisión obtenida estuvo acorde con los criterios de validación establecidos y el límite de determinación fue de 0,013 mg/mL . El método es aplicable en mediciones de rutina como soporte de los estudios de estabilidad de dichas tabletas.

ABSTRACT. Identification of octacosanyl stearate and octacosanyl palmitate as main thermolysis degradation products in film-coated tablets containing 5 mg of policosanol was made by using capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry analysis. In order to quantify these products, a gas chromatographic method, using packed column and docosanyl stearate as internal standard, was developed and validated. The method was shown to give a 99.2 % recovery. Good linearity was proven within the mass ratio range 0.33 to 2.61 (analyte/internal standard). Precision obtained agreed with the established validation criteria and the limit of quantification of the assay was 0.013 mg/mL. The method is suitable for routine measurements in support of stability studies of these tablets.

INTRODUCCION

El policosanol es una mezcla de alcoholes alifáticos de alto peso molecular, cuyo componente mayoritario es el 1-oc-tacosanol.¹ Esta mezcla, aislada y purificada a partir de la cera de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), induce efectos hipocolesterolemizantes en voluntarios sanos² y p acientes con hipercolesterolemia del tipo II.^{3,4}

En los estudios de estabilidad de estante (estudio definitivo para acreditar el tiempo de vencimiento de un medicamento) de las tabletas revestidas que contienen 5 mg de policosanol, no se han detectado productos de degradación aún a los cinco años de almacenaje. Sin embargo, un estudio de estas tabletas bajo condiciones de termólisis durante un tiempo prolongado, seguido del análisis correspondiente por cromatografía gaseosa (CG), demostró que ocurría una disminución del contenido del principio activo, conjuntamente con la aparición de dos picos cromatográficos. El propósito de este trabajo consistió en identificar estos compuestos por CG acoplada a Espectrometría de Masas (EM), así como desarrollar y validar un método por CG con columna de relleno, para su determinación, que pudiera ser utilizado en los estudios de estabilidad de estas tabletas.

MATERIALES Y METODOS

Equipos

Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas modelo MD- 800 (FISON INSTRUMENTS, Inglaterra) con una columna capilar SPB-5 (25 mX0,32 mm d.i.). El horno se programó de 100 a 200 °C a 40 °C/min y de 200 a 320 °C a 8 °C/min, con 80 min isotérmico a la temperatura final. El

flujo del gas portador (helio) fue de 1 mL/min . La temperatura del inyector fue de 300 °C, la de la fuente de 250 °C y la de interfase de 200 °C . El tiempo de barrido fue de 0,9 s; la energía de ionización de 70e V y el volumen de inyección de 1 µL.

Cromatógrafo de gases modelo GC-14 (SHIMADZU, Japón) con un procesador de datos de la misma firma, modelo C-R4A, equipado con detector de ionización por llama y una columna de vidrio (3,1 mX3 mm d.i.) empacada con OV-101 al 3 % sobre Chromosorb HP 80-100 mesh (SUPELCO, USA). El inyector y el detector se calentaron a 320 °C. La temperatura de la columna se mantuvo isotérmica a 320 °C durante 60 min . El flujo de gas portador (argón) fue de 50 mL /min y el volumen de inyección de 3 µL.

Reactivos

N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) y n-hexano, ambos de grado analítico (FLUKA, Suiza).

Estearatos de octacosanilo y de docosanol (> 98 %, CG), utilizados como patrones de referencia e interno respectivamente y sintetizados⁵ en el Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Cuba. Sus disoluciones de referencia se prepararon en n-hexano (0,5 mg/mL).

Degradación de las tabletas

Muestras de tres lotes de tabletas revestidas, con un contenido de 5 mg de policosanol, fueron sometidas durante nueve meses a una temperatura de 55 °C en una estufa bajo condiciones controladas.

Preparación de la muestra

Se seleccionaron veinte tabletas al azar. Se les determinó el peso promedio y se trituraron hasta obtener un polvo homogéneo del cual se tomó la masa equivalente a una ta-

bleta y se trasvasó cuantitativamente a un tubo de ensayos con tapa de rosca y sello inerte. Se le añadieron 2 mL de la disolución del patrón interno y se calentó a 60 ° C durante 10 min , con agitación ocasional. Se filtró en caliente y 0,5 mL del filtrado se pasaron a otro tubo de ensayos, donde se añadieron 0,05 mL de MSTFA. Finalmente, se calentó a 60 ° C durante 15 min .

Método de cálculo

La abundancia de cada producto de degradación se obtuvo por el método del patrón interno, previo cálculo del factor másico de respuesta relativa (f^m) para el patrón de referencia.⁶ Como f^m del palmitato de octacosanilo, se consideró el calculado para el estearato de octacosanilo.

La masa total (Mt), calculada por la sumatoria de las masas encontradas de palmitato y estearato de octacosanilo, se corrigió para determinar el contenido de ésteres en las tabletas (C), según la ecuación siguiente:

$$C = \frac{pp}{pm} \cdot M_t \quad (mg)$$

donde:

pp peso promedio de las tabletas (mg)

pm peso de la muestra analizada (mg).

Validación del método

Para estudiar la linealidad se prepararon muestras a partir de placebo y de cinco alícuotas diferentes de la disolución de referencia, con tres réplicas en cada caso. Luego de llevarlas a sequedad se les aplicó la metodología analítica. Se abarcó un intervalo de relaciones de masa de 0,326 a 2,608 (análito/patrón interno). La ecuación de regresión se calculó por los mínimos cuadrados de las relaciones de área en función de las relaciones de masa. Como criterios de linealidad

se consideraron el coeficiente de correlación (r) > 0,99, el coeficiente de variación (CV) de los factores de respuesta (y/x) < 5% , la desviación estándar (DE) relativa de la pendiente < 2% y el intercepto con el eje Y no significativo para $p=0,05$.⁷

La precisión se determinó por una prueba de reproducibilidad,^{7,8} realizada en dos días por diferentes técnicos, equipos y reactivos, con ocho réplicas en cada caso. Para evaluar estos resultados, se realizaron las pruebas de doble cola de Fisher (f) y Student (t), para $p=0,05$.

La exactitud se estudió por la adición de 1,25 mg de estearato de octacosanilo (punto central de la linealidad) a seis muestras de placebo.⁸ Los resultados obtenidos se compararon con el valor real por una prueba t de doble cola, para $p=0,05$.

El límite de la determinación cuantitativa se obtuvo por el método de extrapolación a concentración cero.⁷ Muestras de placebo fueron contaminadas con tres cantidades diferentes de estearato de octacosanilo, con tres réplicas en cada caso, y luego de llevarlas a sequedad se les aplicó la metodología analítica. La ecuación de regresión se calculó por los mínimos cuadrados de las relaciones de áreas (análito/patrón interno) en función de la concentración del analito (0,156; 0,313 y 0,626 mg/mL).

RESULTADOS Y DISCUSION

Identificación de los productos de degradación

Las muestras sometidas a termólisis presentaron picos cromatográficos (PD1 y PD2) a tiempos de retención elevados (Fig. 1), que no aparecían en los cromatogramas de las muestras originales no degradadas, los cuales no correspondían a ninguno de los alcoholes del policosanol ni a los excipientes. La identificación de estos compuestos fue realizada sobre la base de sus espectros de masas (Figuras 2 y 3).

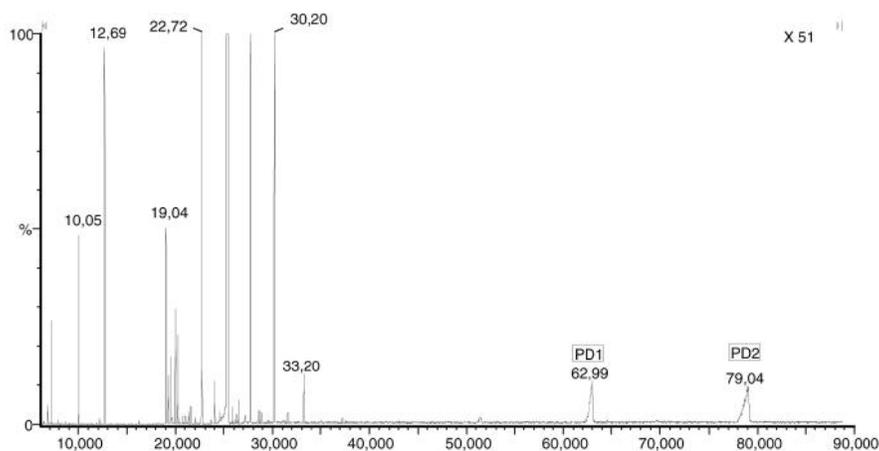


Fig. 1. Cromatograma gaseoso capilar de la tableta de policosanol degradada térmicamente.

Fue identificado el compuesto PD1 como palmitato de octacosanilo (Fig. 2), por el fragmento base a m/z 257, que correspondió al ácido palmítico protonado y el ión molecular M^+ a 648. De igual forma, el fragmento base a m/z 285 (Fig. 3), correspondiente al ácido esteárico protonado y el ión molecular M^+ a 676, permitieron la identificación del compuesto PD2 como el estearato de octacosanilo.

El estearato de magnesio, empleado como lubricante en cantidades de 1,80 mg por tableta, está compuesto por una mezcla de estearato y palmitato de magnesio, según sus especificaciones de calidad. Los productos de degradación encontrados hacen evidente la reacción de dichos excipientes

con los componentes del policosanol para dar lugar a los ésteres correspondientes, principalmente, a los del 1-octacosanol, por ser este el alcohol mayoritario en aquel.

Validación del método analítico

El análisis de mezclas de ésteres alifáticos de cadena larga por CG ha sido ampliamente descrito.⁹⁻¹² Sin embargo, el análisis cuantitativo se limita únicamente a la composición porcentual de los ésteres dentro de la mezcla. En este trabajo se realizó la determinación cuantitativa de los ésteres anteriormente descritos, por el método del patrón interno, previo cálculo del factor másico de respuesta relativa.

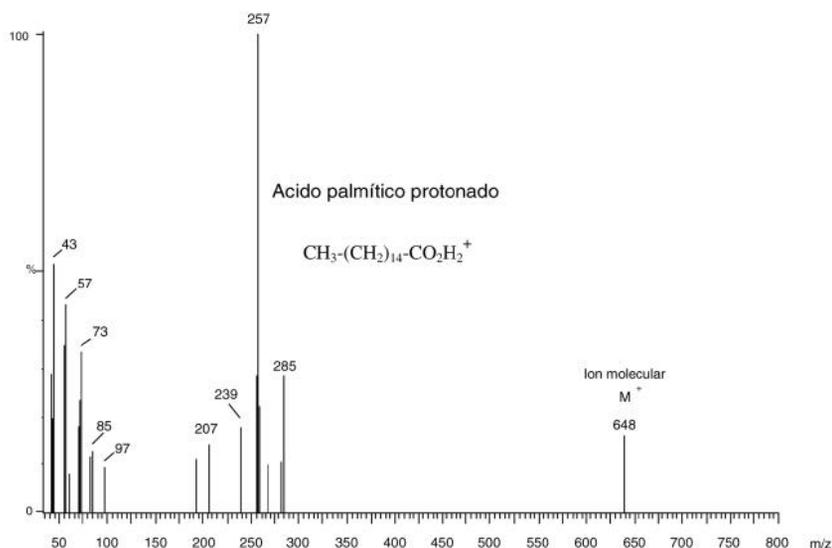


Fig. 2. Espectro de masas correspondiente al pico PD1.

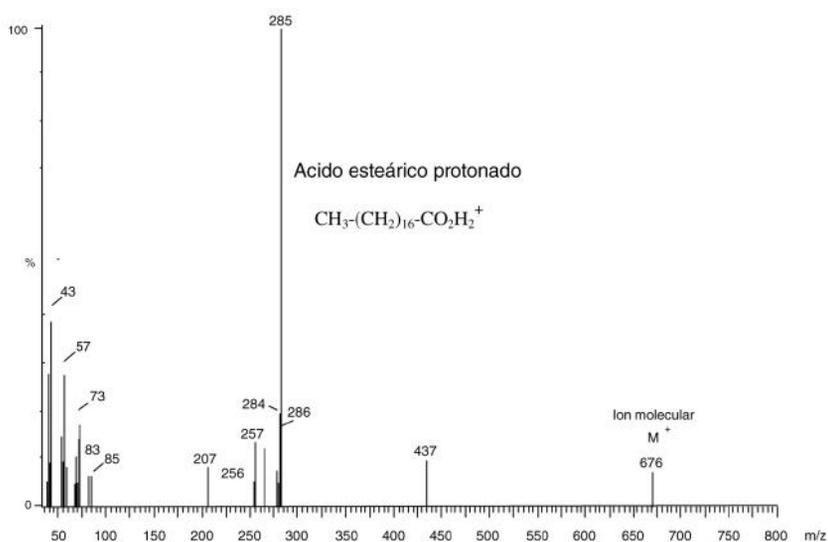


Fig. 3. Espectro de masas correspondiente al pico PD2.

La línea de regresión obtenida del ensayo de linealidad correspondió a la ecuación:

$$y = 0,797x - 0,025$$

cuyo coeficiente de correlación ($r = 0,9976$), indicó la existencia de una correlación positiva con una probabilidad superior al 99,9 %.

La prueba de linealidad demostró que tanto el CV de los factores de respuesta (4,74 %) como la DE relativa de la pendiente (1,88 %), eran menores que los límites establecidos, por lo que se pudo considerar que el método era lineal en todo el intervalo de relaciones de masas estudiado.

Por la prueba de proporcionalidad se determinó que el método no presentaba sesgo, al no ser significativo el intercepto, por encontrarse incluido el cero dentro de sus límites de confianza ($-0,025 \pm 0,052$).

Para determinar la precisión del método se calcularon las variaciones intra e interdía correspondientes a dos series

de análisis cuantitativo para cada éster en una muestra real de tabletas degradadas (Tabla I).

Por las pruebas *f* y *t* se comprobó la no existencia de diferencias significativas entre los resultados correspondientes al análisis cuantitativo de los productos de degradación en ambas series de análisis. Los CV obtenidos intra e interdía resultaron menores de 4 %, límite permitido según Horwitz⁷ para el porcentaje en que se presentaba el analito analizado, lo que indicó que el método presentaba buena repetibilidad y reproducibilidad.

El contenido medio de éster encontrado en el estudio de la exactitud (1,24 mg) representó el 99,2 % de recobrado. Este alto porcentaje de recuperación se explica por la utilización de un patrón interno, que se adiciona al principio de la extracción. Al realizar la prueba *t* se encontró que este valor no se diferenciaba significativamente del real.

El límite de cuantificación encontrado fue de 0,013 mg/mL. Esto indicó que el método era capaz de determinar el principal producto de degradación aún en cantidades de 0,026 mg por tableta.

TABLA I
Precisión del método analítico para el análisis del estearato y el palmitato de octacosanilo
en las tabletas revestidas de policosanol (5 mg)*

Parámetro	Día 1			Día 2			Interdía		
	A	B	Total	A	B	Total	A	B	Total
\bar{x} (mg)	0,510,	721	,240,	540	,721	,260	,520,	721	,25
DE	0,011	,01	0,020,	01	0,010,	02	0,020,	01	0,02
CV(%)	1,95	1,65	1,68	1,71	1,69	1,90	3,55	1,86	2,02

*n = 8.

A Palmitato de octacosanilo.

B Estearato de octacosanilo.

CONCLUSIONES

Mediante la CG-EM fueron identificados el estearato de octacosanilo y el palmitato de octacosanilo como los principales productos de degradación en las tabletas revestidas que contienen 5 mg de policosanol. Se validó un método analítico para la determinación de ambos productos por Cromatografía Gaseosa con columna de relleno, en términos de linealidad, precisión, exactitud y límite de cuantificación, el cual es aplicable en mediciones de rutina, como apoyo a los estudios de estabilidad de dichas tabletas.

RECONOCIMIENTOS

Al Tec. Heriberto Campaña del Laboratorio de Síntesis no Convencional, Microondas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, por la síntesis de los estearatos de docosanilo y octacosanilo.

BIBLIOGRAFIA

- Laguna A., Magraner J., Carvajal D., Arruzazabala M.L., Más R. and García M. Patent Cooperation Treaty EP 937/00007, 5/1/1993.
- Hernández F., Illnait J., Más R., Castaño G., Fernández L., González M., Cordoví N. and Fernández J.C. **Curr. Ther. Res.**, **51**, 568, 1992.
- Aneiros E., Más R., Calderón B., Illnait J., Fernández L., Castaño G. and Fernández J.C. **Curr. Ther. Res.**, **56**, 176, 1995.
- Castaño G., Más R., Nodarse M., Illnait J., Fernández L. and Fernández J.C. **Curr. Ther. Res.**, **56**, 296, 1995.
- Leilani A., Campaña H., Millian V., Loupy A. y Petit A. RPI 105-95, Oficina Nacional de Invenciones, Información Técnica y Marcas, Cuba, 1995.
- Gasco S. Teoría y práctica de la cromatografía en fase gaseosa, Capítulo 9, Ediciones J.E.N., Madrid, 340, 1969.
- Castro M., Gascón S., Pujol M., Sans J.M. y Vicente L. Validación de Métodos Analíticos, A.E.F.I. Catalan Sec., España, 1989.
- FISON Standard Procedure: Protocol for the Validation of Analytical Methods, CHSP 0152Q, U.K., 1991.
- Stransky K. and Streibl M. **Coll. Czechoslov. Chem. Commun.**, **36**, 2267, 1971.
- Tulloch A.P. **Lipids**, **9**, 664, 1974.
- Prasad R.B.N. y Gulz P.G. **Z. Naturforsch**, **45c**, 813, 1990.
- Kattner G., Graeve M. and Ernst W. **J. of Chrom.**, **513**, 327, 1990.