

COMUNICACIÓN CORTA

Nuevo método por Cromatografía Gaseosa Capilar para el análisis del ingrediente activo D002

Víctor L. González, David Marrero, Roxana Sierra, Caridad Velázquez y Roxana Vicente.

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, No. 15202, Playa, Ciudad de La Habana, Apartado 6414, Cuba. Correo electrónico: victor.gonzalez@cnic.edu.cu

Recibido: 25 de junio de 2008. Aceptado: 19 de agosto de 2008.

Palabras clave: D002, cromatografía de gases capilar, validación, método analítico.

Key words: D002, capillary gas chromatography, validation, analytical method.

El D002 consiste en una mezcla de alcoholes superiores que es obtenida de la cera de abejas (*A. mellifera*) y presenta efectos antiinflamatorios,¹ antiulcerosos² y antioxidantes.³ Aunque existe un método para la determinación de D002,⁴ validado según las exigencias de la industria farmacéutica actual, en él se emplea la Cromatografía de Gases (CG) con columna de relleno. Esta columna sin embargo, aunque aún es válida, se encuentra prácticamente en desuso actualmente, habiendo sido sustituida paulatinamente por la columna capilar, con indiscutibles ventajas, fundamentalmente en cuanto a resolución y sensibilidad⁵ y empleada recientemente con muy buenos resultados en la determinación de alcoholes grasos en el policosanol.⁶ Todo lo anterior motivó la validación del método de determinación de D002 ingrediente activo por columna capilar, la que demostró su aplicabilidad en el análisis de esta sustancia.

Se empleó el cromatógrafo 6890N con detector de ionización por llama (Agilent, EUA), con una columna HP-5 (30 m x 0,25 mm d.i. y 0,25 mm de película, Agilent, EUA). Condiciones: isotérmico a 70 °C durante un minuto seguido de una primera rampa a 30 °C/min hasta 200 °C y de una segunda rampa a 8 °C/min hasta 320 °C; detector e inyector a 320 °C, inyección de 0,5 µL, y flujo de gas portador (H_2) 1 mL/min. Se empleó además, la columna HP-5MS de iguales dimensiones y en iguales condiciones, pero con He como gas portador, con un espectrómetro de masas 5975N (Agilent, EUA) y con el inyector a 320 °C, la interfase a 280 °C, la fuente a 250 °C y el cuadrupolo a 150 °C; la energía de ionización fue de 70 eV y se adquirió en el intervalo de 40 a 800 m/z. Se trabajó con D002 ingrediente activo (lotes 010010204 y 030011006, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Cuba). El cloroformo, el *N*-metil,*N*-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA), así como los demás reactivos empleados fueron de calidad analítica (Sigma, EUA) y se prepararon en cloroformo las disoluciones siguientes: disolución de patrón interno (DPI): alcohol C_{20} a 0,4 mg/mL, disolución de referencia de alcoholes 1 (DRA₁): C_{24} , C_{26} , C_{28} y C_{30} a 0,12; 0,13; 0,13 y 0,20 mg/mL, respectivamente, disolución de referencia de alcoholes 2 (DRA₂): alcoholes C_{24} , C_{26} , C_{28} y C_{30} a 0,66; 0,66; 0,66 y 1,02 mg/mL, respectivamente. Disolución matriz de re-

ferencia (DMR): se secaron 0,5 mL de DRA₁ en un vial, se añadieron 0,150 mL de DPI y 0,05 mL de MSTFA, se cerró y se calentó a 65 °C durante 15 min. Disolución patrón de trabajo (DPT): D002 a 3,48 mg/mL.

Para preparar la muestra de ensayo se pesaron ($20 \pm 0,1$) mg de D002. Se añadieron 3 mL de DPI. Se calentó a 65 °C, con agitación ocasional a intervalos hasta disolución. Se trasvasaron 0,5 mL a un vial y se añadieron 0,05 mL de MSTFA. Se cerró y se calentó a 65 °C durante 15 min. Como criterio cualitativo se compararon las retenciones relativas con las obtenidas de un D002 de referencia (lote 010010204), previamente analizado por Cromatografía Gaseosa - Espectrometría de Masas (CG-EM). La cuantificación se realizó por el método del patrón interno, previo cálculo de los factores másicos de respuesta relativa con el empleo de la DMR, según el método anteriormente descrito.⁷

Como criterios de aplicabilidad del sistema se encontró que la resolución cromatográfica (R) permitía una separación adecuada de las señales de interés ($R_{C_{28}-C_{30}} = 9$), y que la repetibilidad de la inyección ($CV < 0,5\%$) garantizaba una buena precisión del sistema inyector-detector, por lo que se pasó a validar la metodología analítica, proceso realizado según las guías vigentes en la industria farmacéutica.⁸⁻¹⁰

Se demostró que el método era lineal entre el 35 y el 140 % de la concentración nominal, para lo cual se secaron y analizaron alícuotas (2, 3, 5, 7 y 8 mL) de la DPT ($n = 3$). La ecuación de regresión, obtenida por las relaciones de áreas en función de las relaciones de masas, fue: $y = (0,92 \pm 0,03)x - (0,26 \pm 0,46)$, con intervalos de confianza calculados para $p = 0,05$. El coeficiente de correlación (0,999), así como los CV de los factores de respuesta (3,39 %) y de la pendiente (1,43 %) cumplieron con los límites de aceptación (0,99; 5 y 2 %, respectivamente) y el cero quedó incluido en los límites de confianza del intercepto, por lo que no hubo sesgo. La exactitud fue probada entre aproximadamente el 50 y el 150 % de la concentración nominal, para lo cual se añadieron 3 mL de la DPT a cuatro grupos de muestras (siendo uno de ellos un blanco) y seguidamente, a tres grupos se les añadieron 1, 3 y 4 mL de la DRA₂. Luego de secar las muestras a 65 °C fueron analizadas. El contenido determinado en el blanco se restó a los obtenidos en los de-

más grupos y se obtuvieron los recobrados individuales (101,05; 99,62; y 99,38 %). Las t_{exp} en cada concentración (1,106; 0,452; y 0,977) fueron menores, con un 95 % de confianza, que la t_{tab} para $n = 3$ (4,303), por lo que no hubo diferencias significativas entre los recobrados y el 100 %.

El método fue preciso con $CV < 2\%$ para el total de alcoholes, tanto en el ensayo de repetibilidad ($n = 10$, un analista, el mismo día y equipo) como en el de precisión intermedia ($n = 3$, 2 analistas, durante tres días, en el mismo equipo, al 75, 100 y 125 % de la concentración nominal. Para los alcoholes individuales, los CV variaron en función de las concentraciones, cumpliendo los criterios de precisión de Horwitz.¹¹ Por la prueba ANOVA se demostró que no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las series de resultados, por lo que los factores concentración, analista y día no influyeron en la dispersión de los resultados.

En el ensayo de robustez, realizado según el diseño de Youdin ($n = 6$),¹⁰ se determinó que los cambios operacionales siguientes: temperatura del inyector y del detector; temperaturas inicial y final del horno (-10°C), flujo de gas portador ($-0,2\text{ mL/min}$), pendiente de la segunda rampa ($+2^\circ\text{C/min}$) y volumen de inyección ($+0,1\text{ mL}$), no afectaban significativamente la retención relativa del C_{30} , la $R_{C_{28}-C_{30}}$, la cuantificación, ni la Desviación Estándar, por lo que el método es robusto ante las variaciones experimentales realizadas. El método también fue específico, sin interferencias entre la señal del patrón interno y las del D002 ingrediente activo (Fig. 1), ni diferencias entre el cromatograma de la muestra original y los de muestras sometidas a condiciones de: hidrólisis ácida y básica (0,1 mol/L de NaOH o HCl, 108°C , 24 h), oxidación (H_2O_2 al 30 %, 7 d), fotólisis (254 nm, 7 d), y termólisis (108°C , 7 d); por lo que, de haberse formado algún producto de degradación, este no interfiere en la determinación del D002. En todos los casos, la pureza de las señales fue comprobada por CG-EM.

El método analítico propuesto puede considerarse validado, siendo posible su empleo en el control de calidad y los estudios de estabilidad de este ingrediente ac-

tivo. Se comprobó que es exacto, lineal y preciso en los intervalos requeridos alrededor de la concentración nominal, así como robusto ante los cambios operacionales estudiados, y específico aun para las muestras sometidas a condiciones de degradación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Carbajal D., Molina V., Valdés S., Arruzazabala L., Más R. and Magraner J. Anti-inflammatory activity of D002: an active product isolated from beeswax, **Prostaglandins, Leucotrienes and Essential fatty acids**, **59**, 235-238, 1998.
2. Hano O., Ilnait J., Más R., Fernández L., Piñol F., and Fernández J. Effects of D002, a product isolated from beeswax, on duodenal ulcer. **Curr. Ther. Res.**, **62**, 394-407, 2001.
3. Menéndez R., Magraner J., Ilnait J., Pérez J., Amor A.M., *et al.* Effects of D002 on lipid peroxidation in older subject. **J. Med. Food**, **4**, 71-77, 2001.
4. González V., Magraner J., Sierra R. y Rodríguez E. Método para la determinación por CG del contenido de D002, una nueva sustancia biológicamente activa purificada de la cera de abejas. **Revista CENIC Ciencias Químicas**, **37**, 21-22, 2006.
5. Traitler H., Recent advances in capillary gas chromatography applied to lipid analysis. **Prog. Lipid Res.**, **26**, 257-280, 1987.
6. González V., Marrero D., Sierra R., and Velázquez C., Capillary Gas Chromatography of the fatty alcohols ($C_{24}-C_{34}$) composing policosanol in 5 and 10 mg film-coated tablets. **Lat. Am. J. Pharm.**, **26**, 900-3, 2007.
7. Sierra R., González V., Magraner J. y Cuellar A., Desarrollo y validación de un método por cromatografía gaseosa para la determinación de D002 en tabletas. **Revista CENIC Ciencias Químicas**, **35**, 127-130, 2004.
8. ICH-Harmonized Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Methodology. Q2B, Nov., 1996.
9. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos, Validación de Métodos Analíticos, Regulación No. 41-2007, Ministerio de Salud Pública, Cuba, 2007.
10. Castro M., Gascón S., Pujol J. y Vicente I., Validación de métodos analíticos, Sec. Catalana, Comisión de Normas de BP de Fabricación y Control de Calidad, 1989.
11. W. Horwitz, Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs, **J. AOAC**, **65**, 525-530, 1982.

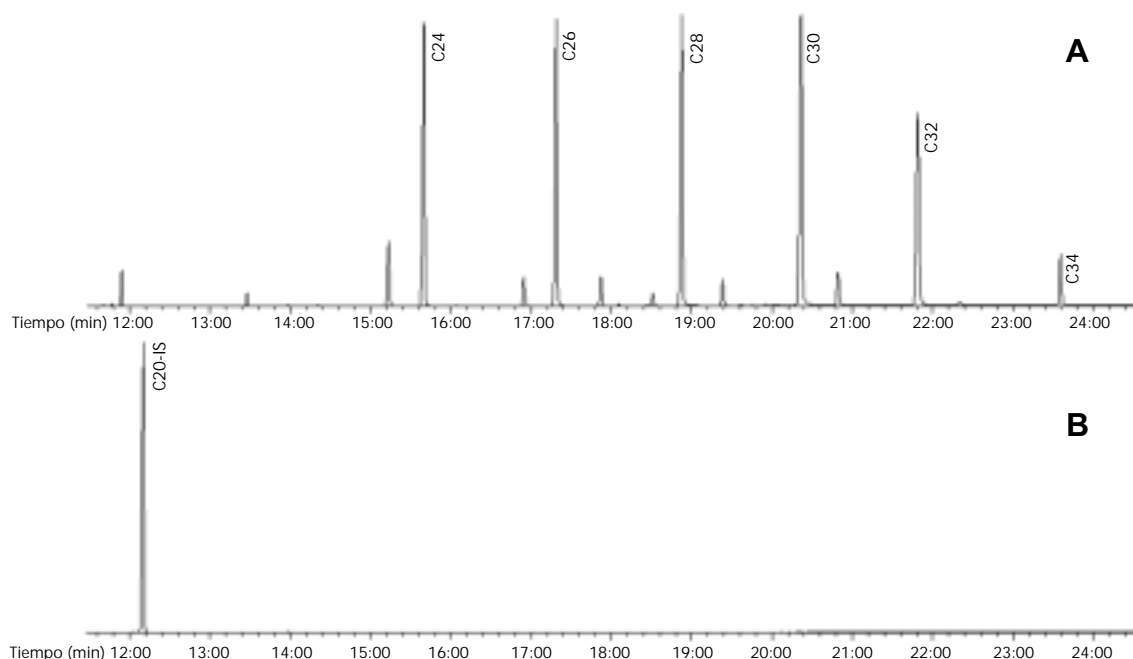


Fig. 1. Cromatogramas de gases parciales del ingrediente activo D002 (A) y del estándar interno (B), derivatizados con MSTFA.