

Desarrollo y validación de un método por Cromatografía Gaseosa para la determinación de D002 en tabletas

Roxana de la C. Sierra Pérez, Víctor L. González Canavaciolo, Juan Magraner Hernández y Armando Cuéllar Rojas.

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Calle 198 entre 19 y 21, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 22 de agosto de 2003. Aceptado: 6 de octubre de 2003.

Palabras clave: D002, tabletas, cromatografía gaseosa, validación.
Key words: D002, tablets, gas chromatography, validation.

RESUMEN. Se desarrolló y validó una técnica analítica para la determinación de D002 en tabletas con dosis de 50 y 100 mg, la cual puede ser utilizada en los controles de calidad y estudios de estabilidad de estas formas terminadas. El método se basa en la extracción con cloroformo del principio activo y la utilización de 1-eicosanol como patrón interno y *N*-metil-*N*-(trimetilsilil)trifluoroacetamida como agente derivatizante. Los análisis fueron realizados por Cromatografía de Gases con columna de relleno de vidrio silanizado (3 m, con 3 mm de diámetro interno) utilizando como fase estacionaria OV 101 al 3 % sobre Cromosorb W AW-DMSC de 80 a 100 mallas. Se comprobó que el método responde linealmente en todo el intervalo de masas estudiado (entre 50 y 150 % de la dosis nominal) con coeficiente de correlación de 0,999, coeficiente de variación de los factores de respuesta de 0,875 % y una desviación estándar relativa de la pendiente de 0,137 %. La exactitud se determinó a través de los recobrados, los que se encontraron entre 99,72 y 100,39 % y no se diferenciaron significativamente del 100 %, según la prueba *t* de Student para $P = 0,05$. La repetibilidad ($n = 10$) y la precisión intermedia ($n = 6$, por 4 d) se estudiaron en un intervalo de 80 a 120 % de la concentración nominal, las precisiones estuvieron dadas por coeficientes de variación (CV) < 2 % en todos los casos y no se encontraron diferencias significativas entre las dispersiones ni las medias obtenidas en los diferentes días, según las pruebas *F* de Fisher y *t* de Student para $p = 0,05$.

ABSTRACT. An analytical method for determining D002 in 50 and 100 mg tablets was developed and validated. This method can be used as part of the quality control and stability studies of these finished pharmaceutical forms. This method is based on the extraction of the active principle with chloroform and the addition of 1-eicosanol as internal standard and *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide as derivatizing agent. Silanized glass packed column (3 m, with 3 mm de internal diameter) filled with 3 % OV 101 on Chromosorb W AW-DMSC was used for the analysis. It was proved that in the studied mass range (between 50 and 150 % of the nominal doses), the method is linear, with a correlation coefficient of 0.999. Relative standard deviation of response factors of 0.875 % and standard deviation of slope of 0.137 % fulfilled too the acceptance criteria. Accuracy was assessed through a recovery study, values were between 99.72 y 100.39 %, which were not significantly different form 100 %. The repeatability ($n = 10$) and intermediate precision ($n = 6$, for 4 d) were assessed from 80 a 120 % of the nominal concentration, in all cases the method was precise, according to variation coefficient (CV) < 2 %, no significant differences were found in either the precision or the means obtained in the different days, according Fisher *F* and Student *t* tests for $p = 0.05$.

INTRODUCCION

El D002 es una mezcla de alcoholes alifáticos primarios de alto peso molecular, extraída y purificada a partir de la cera de abejas (*Apis Mellifera*),¹ la cual presenta efectos anti-inflamatorios, anti-ulcerosos, y anti-oxidantes,²⁻⁴ así como ausencia de toxicidad en especies roedoras y no roedoras.^{5,6} Dadas las potencialidades de este producto para su utilización en seres humanos, se elaboraron dos formas terminadas con igual composición de excipientes, pero diferentes cantidades de D002. Estas fueron tabletas con dosis de 50 y 100 mg de principio activo, cuyo control de calidad requirió el desarrollo y validación de una metodología analítica con la precisión y exactitud que requiere la Industria Farmacéutica actual, lo cual fue el objetivo del presente trabajo. Para el desarrollo del método se utilizó la cromatografía gaseosa (CG) con columna de relleno, teniendo en cuenta experiencias previas en la determinación de mezclas de alcoholes de alto peso molecular tanto en la cera de abejas como en la cera de caña de azúcar.⁷⁻⁹

MATERIALES Y METODOS

Equipo

Se utilizó un cromatógrafo de gases GC14A acoplado a computadora C-R4A (Shimadzu, Japón) Condiciones cromatográficas: columna de vidrio silanizada (3,1 m X 3 mm d.i.), empacada con la fase OV-101 al 3 %

sobre Chromosorb W AW-DMCS (80 a 100 mallas). Programación: de 250 a 320 °C a 15 °C/min y 20 min isotérmico a 320 °C. Los flujos de gas portador argón, hidrógeno y aire, fueron de 30, 30 y 300 mL/min respectivamente. El detector y el inyector se calentaron a 320 °C y el volumen de inyección fue 2 µL.

Reactivos y disoluciones

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico.

Patrones de referencia: 1-eicosanol, 1-tetracosanol, 1-hexacosanol, 1-triacontanol (FLUKA, Suiza) y 1-octacosanol (Sigma, USA).

N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA, FLUKA, Suiza).

Cloroformo (Merck, Alemania).

Tabletas de D002 con dosis de 50 y 100 mg (lotes 040695 y 100497 respectivamente, MedSol, Cuba).

Muestra de referencia de D002 principio activo (lote AA0702).

Disolución de patrón interno (DPI): 1-eicosanol (0,4 mg/mL) en cloroformo.

Disolución de referencia de alcoholes (DRA): 1-tetracosanol, 1-hexacosanol, 1-triacontanol y 1-octacosanol, todos a 0,12 mg/mL en cloroformo.

Disolución matriz de referencia de alcoholes (DMRA): Se tomaron 250 µL de la DRA y se llevaron a sequedad a 60 °C en corriente de aire. Se adicionaron 150 µL de DPI y 50 µL de MSTFA. Se calentó a 60 °C durante 15 min previo al análisis por CG (n = 3).

Preparación de la muestra de ensayo

Se tomaron 20 tabletas al azar, se les determinó la masa promedio y se trituraron hasta obtener un polvo fino y homogéneo. En un tubo de ensayos de 15 mL se pesó, con exactitud de 0,1 mg, una cantidad equivalente a 50 mg de principio activo, o sea, el peso promedio de la tableta con dosis de 50 mg o la mitad del peso promedio de la tableta con dosis de 100 mg. Se añadieron 10 mL de DPI, se calentó a ebullición con agitación ocasional durante 30 min. Se filtró en caliente a otro tubo de ensayos, se transfirió una alícuota de 150 µL a un vial de 1,8 mL, se le adicionaron 50 µL de MSTFA y se calentó durante 30 min a 60 °C para su análisis por CG.

Identificación y cuantificación

La identificación de los componentes del D002 en la tableta se rea-

lizó por comparación de sus retenciones relativas con las obtenidas en iguales condiciones para una muestra de D002 de referencia, previamente analizada por CG acoplada a Espectrometría de Masas. La cuantificación se realizó por el método del Patrón Interno,⁷ previo cálculo de los factores másicos de respuesta relativa y teniendo en cuenta las consideraciones descritas anteriormente.⁹ La masa de D002 se calculó por la suma de las masas halladas para cada uno de los alcoholes de número par de átomos de carbono entre el C₂₄ y el C₃₄, dicha masa total se corrigió para tener en cuenta la masa de muestra analizada (aproximadamente la masa de las tabletas con dosis de 50 mg y la mitad de la masa de las tabletas con dosis de 100 mg), así como la masa promedio de las tabletas, según método de cálculo descrito anteriormente.¹⁰

Validación de la metodología

La especificidad del método se estudió al comparar los cromatogramas correspondientes a las tabletas, el patrón interno, las tabletas placebo y una muestra de referencia de D002 materia prima.

El estudio de la linealidad y exactitud del método se realizó a partir de placebos contaminados con 25, 40, 50, 60 y 75 mg de principio activo (n = 5). La ecuación de regresión y el coeficiente de correlación se obtuvieron por el método de los mínimos cuadrados. Para ello, se analizaron las masas obtenidas (y) en función de las masas añadidas (x), además, se realizaron pruebas de linealidad y proporcionalidad. Como criterios de linealidad se consideraron el coeficiente de correlación (r) > 0,99, el coeficiente de variación de los factores de respuesta (CV_p) < 5 % y el intercepto con "y" no significativo para un 95 % de confiabilidad. La exactitud se determinó mediante el cálculo de los recobrados en cada punto del estudio de linealidad, a los que se les aplicó además, la prueba estadística *t* de Student para p = 0,05.¹¹

El estudio de repetibilidad se realizó con tabletas de ambas dosis por un analista en el mismo día y equipo (n = 10), mientras para el estudio de precisión intermedia se emplearon muestras de tabletas con dosis de 40, 50 y 60 mg, correspondientes a 80, 100 y 120 % de la concentración nominal. Este segundo estudio de precisión se realizó durante cuatro días, en todos los cuales, se analizaron seis réplicas independientes. El

criterio de aceptación empleado fue que el CV de las determinaciones fuese < 2 %, y que no hubiera diferencias significativas entre las dispersiones ni las medias obtenidas en los diferentes días, según las pruebas *F* de Fisher y *t* de Student para p = 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSION

Especificidad

En el estudio de especificidad (Fig. 1) se pudo observar que las condiciones cromatográficas empleadas permiten la determinación de los seis alcoholes que conforman el D002 con buena resolución. Las señales correspondientes al patrón interno y a los excipientes utilizados en la fabricación de las tabletas no interfieren en la determinación del principio activo, por lo que se puede afirmar que el método es específico para el análisis del D002 en estas formas terminadas.

Linealidad y exactitud

La ecuación de regresión obtenida en el estudio de linealidad fue

$$y = (0,995 \pm 0,005) x + (0,222 \pm 0,238)$$

con límites de confianza calculados para p = 0,05. El coeficiente de correlación (r = 0,999) fue superior al límite de aceptación, lo que indica una correlación positiva con una probabilidad superior al 99,9 %. Los parámetros correspondientes a las pruebas de linealidad (CV_f = 0,875; S_{b(rel.)} = 0,137) y proporcionalidad (inclusión del cero entre los límites de confianza del intercepto), prueban que el método es lineal y no presenta sesgo en el intervalo de masas estudiado. Los recobrados obtenidos en el estudio de linealidad (Tabla 1) fueron sometidos a la prueba estadística *t* de Student, y en todos los casos $t_{exp.} < t_{tab.}$ (2,776) para un 95 % de confiabilidad, lo que demuestra que dichos recobrados no se diferencian estadísticamente del 100 % y el método es exacto en todo el intervalo.

Precisión

En el estudio de repetibilidad se determinaron dosis de 49,87 y 99,73 mg de D002 para los dos lotes analizados, con CV de 1,04 y 0,96 %, respectivamente. Tanto en éste como en el estudio de precisión intermedia (Tabla 2), se obtuvieron CV inferiores al límite de aceptación (2 %). La comparación de las dispersiones y las medias obtenidas en el estudio de precisión intermedia arrojó que

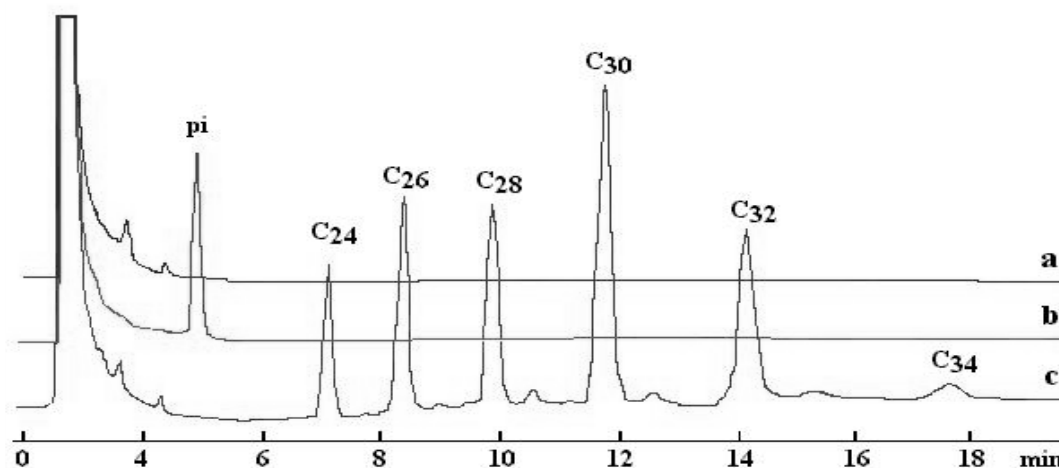


Fig. 1. Perfiles cromatográficos de a) tabletas placebo, b) patrón interno y c) tabletas de D002.

pi Patrón interno. C₂₄ Tetracosanol. C₂₆ Hexacosanol. C₂₈ Octacosanol. C₃₀ Triacontanol. C₃₂ Dotriacontanol. C₃₄ Tetratriacontanol.

Tabla 1. Resultados de la determinación de la linealidad y exactitud del método (n = 5).

Punto	Masa (mg)		Recobrado (%)	t _{exp.}
	Añadida	Obtenida		
A	25	25,13	100,07	0,34
B	40	40,02	100,38	0,50
C	50	50,07	99,91	0,44
D	60	59,79	99,79	0,79
E	75	74,95	99,22	0,38

Tabla 2. Resultados de la determinación de la precisión intermedia del método.

Dosis (mg)	Día	Media (mg)	DE	CV (%)
40	1	39,85	0,58	1,45
	2	39,88	0,35	0,88
	3	39,85	0,33	0,83
	4	40,05	0,29	0,72
50	1	49,77	0,31	0,63
	2	50,24	0,56	1,11
	3	50,27	0,88	1,76
	4	49,61	0,73	1,49
60	1	59,65	0,57	0,96
	2	60,29	0,52	0,86
	3	60,47	0,87	1,45
	4	59,82	0,48	0,80

no existían diferencias significativas entre los resultados de los diferentes días, tanto las $F_{exp.}$ como las $t_{exp.}$ (Tabla 3) fueron inferiores a las tabuladas para $p = 0,05$. Por todo lo anterior, se puede considerar que el método es preciso.

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados expuestos se puede concluir que

el método validado puede ser empleado en el control de calidad de las tabletas con dosis de 50 y 100 mg de D002.

BIBLIOGRAFIA

1. Magraner J., Laguna A., Más R., Arruzazabala M.L., Carbajal D., Díaz M., Molina V., and Valdés S., Una mezcla natural compuesta por alcoholes alifáticos primarios superiores obtenidos de la cera de abejas para el tratamiento

de las úlceras gástricas y duodenales que presenta también actividad antiinflamatoria, Patente CU 22 412, 1995. USA Patent 6, 235, 795.

- Carbajal D., Molina V., Valdés S., Arruzazabala M.L., Más R. y Magraner J. Anti-inflammatory activity of D-002: an active product isolated from beeswax. **Prostaglandins, Leucotrienes and Essential Fatty acids**, 59, 4, 235, 1998.
- Hano O., Illnait J., Más R., Fernández L., Piñol F., Fernández J. Effects of D-002, a Product Isolated from Beeswax, on Duodenal Ulcer: A Double-Blind, Placebo-Controlled Study. **Curr. Ther. Res.**, 62, 394-407, 2001.
- Menéndez R., Más R., Illnait J., Pérez J., Amor A.M., Fernández J.C., González R.M. Effects of D-002 on lipid peroxidation in older subjects. **J. Med. Food**, 4, 71-77, 2001.
- Rodeiro I., Alemán C., Noa M., Rendón A., Más R., Fernández S.I., Acosta P.C., Hernández C., Briñis F. Oral toxicological studies of D-002 in mice. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, 30, 73-76, 1999.
- Alemán C.L., Rodeiro I., Noa M., Menéndez R., Gámez R., Hernández C., Más R. One-year dog toxicity study of D-002, a mixture of aliphatic alcohols. **J. Appl. Toxicol.**, 21, 179-184, 2001.
- Deroux M., González V.L., Magraner J. Desarrollo y validación de una metodología por cromatografía gaseosa para la determinación de alcoholes totales en cera de abejas. **Revista CENIC Ciencias Químicas**, 31, 23-26, 2000.
- Novak J. and Leclercq P.A., Quantitative Analysis by Gas Chromatography, Dekker, New York, N.Y., 1988.
- González V. y Magraner J. Metodología analítica por Cromatografía Gaseosa para la determinación de los alcoholes alifáticos superiores que componen el policosanol. **Revista CENIC Ciencias Químicas**, 29, 123-126, 1998.

Tabla 3. Comparación de las dispersiones y medias del estudio de precisión intermedia.

Masas añadidas (mg)	Días a comparar	F _{exp.}	t _{exp.}
40	1 - 2	2,720	0,103
	1 - 3	3,010	0,018
	1 - 4	4,029	0,760
	2 - 3	0,608	1,512
	2 - 4	1,481	0,929
	3 - 4	1,339	1,087
50	1 - 2	0,318	1,776
	1 - 3	0,126	1,312
	1 - 4	0,184	0,512
	2 - 3	0,397	0,090
	2 - 4	0,577	1,677
	3 - 4	1,452	1,427
60	1 - 2	1,236	2,049
	1 - 3	0,430	1,941
	1 - 4	1,449	0,575
	2 - 3	0,348	0,442
	2 - 4	1,173	1,640
	3 - 4	3,368	1,608

F_{tab} (0,05; 5; 5) = 5,05. t_{tab} (0,05; 12) = 2,228.

10. González V. L., Magraner J., Cabrera L. y Rivero B. Identificación por CG-EM y determinación por CG de los productos de degradación por termólisis en tabletas revestidas de policosanol (5 mg) **Revista CENIC, Ciencias Químicas**, 29, 27-30, 1998.
11. Castro M., Gascon S., Pujol M., Sans J.M. y Vicente L. Validación de métodos analíticos, Hewlett Packard, A.E.F.I., Sec. Catalana, Comisión de Normas de Buenas Prácticas de Fabricación y Control de Calidad, 1989.



ACTIVIDADES CIENTIFICAS
MINISTERIO DE EDUCACION SUPERIOR DE CUBA

CONFERENCIA INTERNACIONAL SOBRE COMUNIDADES MINERAS

Facultad de Humanidades, Instituto Superior Minero Metalúrgico
"Antonio Núñez Jiménez" de Moa, Holguín.

Del 2 al 4 de noviembre de 2004.

OBJETIVOS

- Propiciar las relaciones entre profesionales y gestores de comunidades mineras.
- Contribuir al desarrollo de las investigaciones relacionadas con el desarrollo tecnológico de la minería y el fomento de los valores culturales de sus comunidades.
- Crear un espacio de reflexión entre representantes de diferentes Comunidades Mineras en el mundo.

TEMATICAS

- Desarrollo, Medio Ambiente y Salud.
- Identidad Cultural, Tradición y Patrimonio Minero.
- Comunidad Científica y los Retos de la Sustentabilidad en la Minería.
- Cultura, Arte y Literatura en Comunidades Mineras.
- Familia, Género y Participación Ciudadana.

CORRESPONDENCIA

M.Sc. Guillermo Padilla Martínez
Presidente del Comité Organizador.

Teléf.: (53)(24) 64014; (53)(24) 66614. Fax (53)(24) 6 2290.
e-mail: gpadilla@ismm.edu.cu

Ing. Josefa Mestre Lamorú
Secretaria Ejecutiva del Comité Organizador.

Teléf.: (53)(24)66234. Fax: (53)(24) 62290.
e-mail: jmestre@ismm.edu.cu jmestre@ismm.moa.minbas.cu

Instituto Superior Minero Metalúrgico "Antonio Núñez Jiménez", Moa, Holguín, Cuba. Código Postal 83329.