

Validación de un nuevo método analítico por CG con columna capilar para la determinación de alcoholes de alto peso molecular en policosanol ingrediente activo

David Marrero Delange¹, Víctor L. González Canavaciolo, Roxana Sierra Pérez y Caridad Velásquez G.

Centro de Productos Naturales, CNIC, Ave 25 y 158, # 15202, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. A. A. 6414. Fax: (537) 273 68 37 Teléfono: (537) 271 4225.

¹ Correo electrónico: david.marrero@cnic.edu.cu - david_delange@yahoo.com

Recibido para evaluación: septiembre 10 de 2007

Aceptado para publicación: marzo 10 de 2008

RESUMEN

El policosanol es una mezcla de 8 alcoholes alifáticos primarios (C_{24} - C_{34}), aislada y purificada a partir de la cera de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), cuya eficacia como reductor del colesterol, tolerabilidad y seguridad han sido demostradas. Diversos métodos han sido previamente validados para determinar policosanol mediante cromatografía gaseosa (CG) con columna empacada. Sin embargo, las ventajas logradas con la CG capilar la hacen superior y mundialmente extendida en la actualidad respecto a las empacadas. Se desarrolló y validó un nuevo método por CG utilizando una columna capilar para determinar los alcoholes grasos que componen el policosanol ingrediente activo. Los alcoholes fueron analizados como derivados trimetilsil. Se comprobó que el método tuvo una buena linealidad ($r^2 = 0,9954$, $CV_{\text{respuesta}} = 1,07\%$, $CV_{\text{pendiente}} = 1,89\%$ y el intervalo de confianza del intercepto incluyó el cero, por lo que no hubo sesgos) y exactitud (recobrado promedio = 100,45%) en todo el intervalo de concentración estudiado de 80-120%. También se demostró su selectividad con muestras sometidas a condiciones de estrés. La repetibilidad y precisión intermedia a la concentración nominal cumplieron los criterios de aceptación (< 2%). La robustez se evaluó mediante un diseño experimental intralaboratorio, en el cual se realizaron siete cambios operacionales, y no se encontraron efectos significativos sobre los resultados observados. El método fue exitosamente validado, y fue apropiado para el control de la calidad y para estudios de estabilidad de este ingrediente activo.

Palabras clave: Alcoholes de alto peso molecular, cromatografía gaseosa, Policosanol, validación.

SUMMARY

Validation of a new capillary column GC analytical method for determining long chain fatty alcohols in policosanol active ingredient

Policosanol is a mixture of 8 long chain primary aliphatic alcohols (C_{24} - C_{34}), isolated and purified from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) wax, with cholesterol-lowering efficacy, safety and tolerability has been demonstrated. Several methods for determining policosanol by packed GC column have been previously validated. However, the advantages achieved with the capillary GC make it worldwide currently extended and overcome to the packed ones. A new gas chromatographic method using a capillary column was developed and validated for the determination of the fatty alcohols that compose policosanol active ingredient. The alcohols were analyzed as trimethylsilyl derivatives. Good linearity ($r^2 = 0,9954$, $CV_{\text{response}} = 1,07\%$, $CV_{\text{slope}} = 1,89\%$) and the confidence interval included the zero, then there was no bias) and accuracy (mean recovery = 100,45%) of the method were proven over a range of 80-120% of the nominal concentration. It was also proved its specificity even when samples were subject to stress conditions. Repeatability and intermediate precision at the nominal 100% value fulfilled the acceptance criteria (< 2%). Ruggedness was evaluated through an intralaboratory experimental design, in which seven operational changes were made, and there was not found any effect on the observed results. The method was successfully validated being suitable for the quality control process and the stability studies of this active ingredient.

Key words: Gas chromatography, long chain fatty alcohols, Policosanol, validation.

INTRODUCCIÓN

El Policosanol es una mezcla de alcoholes alifáticos primarios de elevado peso molecular (C_{24} - C_{34}), aislada y purificada a partir de la cera de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*, L.). Estos alcoholes se encuentran en una proporción definida [C_{24} (0,01-2%), C_{26} (3-10%), C_{27} (0,1- 3%), C_{28} (60-70%), C_{29} (0,1-2%), C_{30} (10-15%), C_{32} (5-10%), y C_{34} (0,1-5%)] (1), la cual garantiza su utilización como ingrediente activo en la industria farmacéutica y sustenta su eficacia, seguridad y tolerancia (2-3). Diversas metodologías analíticas por cromatografía gaseosa (CG) con columnas de relleno han sido validadas para llevar a cabo la determinación de estos alcoholes, tanto en el material insaponificable de las ceras como en sus extractos purificados (4-6). Sin embargo, a pesar de los buenos resultados logrados con estas columnas, actualmente se ha impuesto el empleo de las columnas capilares, por su mayor resolución, sensibilidad, inercia, estabilidad química y térmica, entre otras ventajas (7-8). Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente trabajo fue validar un método confiable para controlar la calidad y los estudios de estabilidad

de alcoholes grasos en policosanol ingrediente activo, mediante la CG con columna capilar "megabore".

Los reactivos empleados fueron de pureza analítica: patrones de alcoholes > 99% CG y MSTFA (Sigma, EE.UU.), cloroformo y acetona (Merck, Alemania). Se prepararon las siguientes disoluciones: patrón interno (DPI): C₂₀ (0,4 mg/mL) en cloroformo. Referencia de alcoholes (DRA): 1- tetracosanol (C₂₄) 0,12 mg/mL; 1-hexacosanol (C₂₆) 0,24 mg/mL; 1-octacosanol (C₂₈) 2,23 mg/mL; y 1- triacontanol (C₃₀) 0,43 mg/mL en cloroformo. Matriz de referencia (DMR): a un vial de 2 mL, se añadieron 0,5 mL de la DRA y se llevó a sequedad mediante flujo de aire y calentamiento a 65 °C. Posteriormente se adicionaron 0,15 mL de DPI, 0,05 mL de MSTFA y se calentó a 65 °C durante 15 min. Patrón de trabajo (DPT): lote 031041205 (91,7% de pureza, CNIC, Cuba) a 2,4 mg/mL en cloroformo.

METODOLOGÍA

Preparación de las muestras

Se pesaron, con exactitud de 0,1 mg, 20 mg policosanol ingrediente activo en un tubo de ensayos de 12 mL y se adicionaron 3 mL de DPI. Se calentó a 65°C, con agitación ocasional hasta disolución. Se tomó una alícuota de 100 µL, que se trasladó a otro tubo de ensayo y se adicionaron 50 µL de MSTFA. Se calentó durante 15 minutos a 65°C para su análisis por CG.

Los análisis se realizaron en un cromatógrafo de gases (GC-14A) con detector de ionización por llama (DILL), acoplado a computadora C-R4A (Shimadzu, Japón). Se utilizó una columna capilar de sílice fundida (25 m x 0,53 mm d.i.) con espesor de película de 1,5 µm de fase inmobilizada ZB-5 (Phenomenex, EE.UU.). La columna se acopló, por medio de un adaptador, al inyector de la columna de relleno, donde se colocó un vaporizador de vidrio con una porción de lana de vidrio, ambos silanizados. La velocidad lineal del gas portador (hidrógeno) fue de 147,0 cm/s (19,4 mL/min) y para la formación de la llama se utilizaron flujos de 40 y 400 mL/min, para hidrógeno y aire, respectivamente. El horno se programó de 230 a 330 °C a 8 °C/min y 6 minutos isotérmico a la temperatura final. El inyector se calentó a 320 °C y el detector a 330 °C. El volumen de inyección fue de 1 µL.

La identificación de los alcoholes se realizó por comparación de las retenciones relativas con las de una muestra previamente analizada por CG-EM, según procedimiento anteriormente descrito (5). La cuantificación se llevó a cabo por el método del patrón interno, tras realizar el cálculo de los factores másicos de respuestas, los que estuvieron entre 0,98 y 1,08, hecho que demuestra una buena eficiencia en la ionización y baja discriminación. Estos resultados garantizan una adecuada cuantificación, coincidiendo con lo descrito en otros trabajos (4-6).

La aplicabilidad del sistema se midió por la resolución (R) entre los alcoholes C_{28} - C_{29} y C_{29} - C_{30} ($n=3$), y por la repetibilidad de la inyección ($n=6$). Los resultados de estos ensayos ($R>2,5$ y $CV=0,46\%$) garantizaron una buena separación entre las señales y una buena precisión del sistema cromatográfico (9,10). Se comprobó que el método era selectivo (Figura 1) al no encontrarse interferencia entre la señal correspondiente al patrón interno (C_{20}) y las obtenidas para el policosanol IA. Muestras sometidas a las condiciones de estrés descritas en trabajos previos (4, 5) tampoco mostraron nuevas señales que pudieran interferir con los analitos de interés ni con el patrón interno. En la Figura 1 se presenta el cromatograma representativo obtenido por termólisis. La pureza de las señales fue corroborada mediante CG-EM, como se describió en trabajos previos (4, 5).

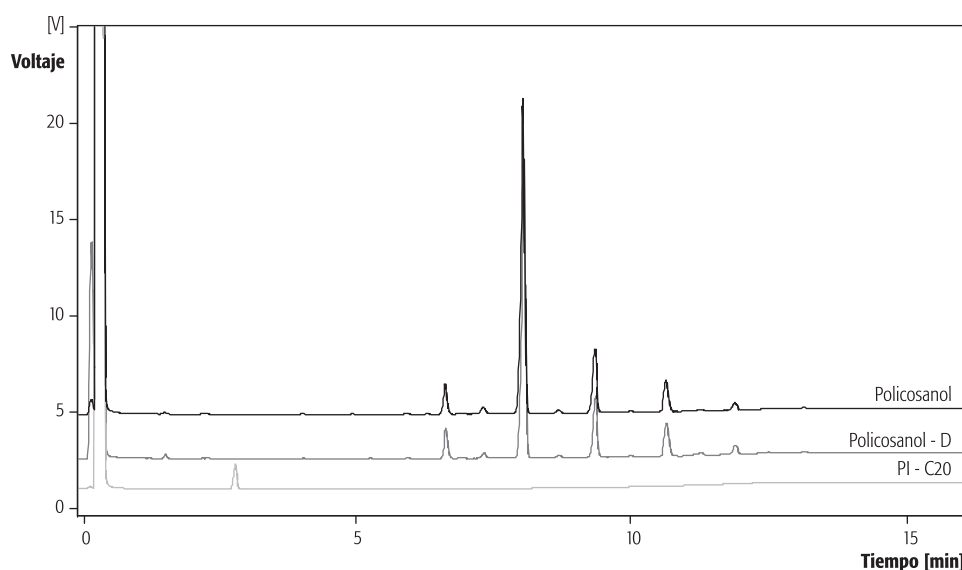


Figura 1. Superposición de los cromatogramas representativos de policosanol (cromatograma superior), policosanol sometido a termólisis (cromatograma medio) y patrón interno (cromatograma inferior).

El estudio de linealidad se realizó con cinco puntos y tres réplicas para cada uno (16, 18, 20, 22 y 24 mg), los cuales representan aproximadamente el 80, 90, 100, 110 y 120% de la cantidad de policosanol que se analiza según la metodología de preparación, que es pesando 20 mg del ingrediente activo, lo cual representa el 100%. La ecuación de regresión para el total de los alcoholes, calculada al graficar las relaciones de áreas obtenidas ($y = A_i/A_{pi}$) en función de las relaciones de masas añadidas ($y = m_i/m_{pi}$), fue: $y = (0,818 \pm 0,034) x - (0,336 \pm 0,560)$, con intervalos de confianza calculados para un 95% de confiabilidad. El coeficiente de correlación ($r = 0,9974$) y determinación ($r^2 = 0,9949$) fueron mayores que el límite de aceptación (0,99 y 0,98 respectivamente), el CV de los factores de respuesta ($CV_f = 1,07\%$) y el CV de la pendiente ($CV_b = 1,89\%$) fueron menores que los límites de aceptación (5 y 2%, respectivamente), y el intervalo de confianza del intercepto incluyó el cero, lo cual

indica la ausencia de sesgo. Dichos parámetros cumplieron con los criterios de aceptación (9,10), por lo que se puede considerar que el método presenta linealidad.

Tras realizar el análisis de los resultados, no se detectó diferencia significativa entre el recobrado promedio (100,4%) y el 100%, ya que la t_{exp} (0,779) fue inferior a la t_{tab} (2,306, $\alpha = 0,05$; GL = 8), lo que indica que el método fue exacto en todo el intervalo de concentraciones estudiado, desde 80 hasta 120% de la masa nominal de estos alcoholes.

La precisión se evaluó mediante ensayos de repetibilidad (un mismo analista realizó 10 replicas de análisis de la misma muestra, en el mismo día y en el mismo equipo) y de precisión intermedia (dos analistas analizaron tres muestras en tres días diferentes, $n = 18$). Se obtuvo un CV de la repetibilidad y un CV promedio para la precisión intermedia (0,79 y 0,94%, respectivamente), valores inferiores al límite establecido para los métodos cromatográficos (2%) (9,10), por lo que se puede considerar que el método es preciso. También se comprobó, mediante la prueba de Anova, ausencia de diferencias significativas entre analistas y entre días en cuanto a la determinación del contenido de alcoholes totales ($p = 0,2572$), lo cual confirma la buena precisión del método.

También se determinó la robustez del método mediante la variación de los siguientes parámetros operacionales: temperatura del inyector, detector, inicial y final del horno (todas -10 °C), flujo de gas portador (+ 2 mL/min), gradiente de temperatura (+ 2 °C/min) y volumen de inyección ($\pm 0,5 \mu\text{L}$). El total de alcoholes determinados (mg), la desviación estándar de esta determinación, la resolución entre los alcoholes C_{28} y C_{30} y la retención relativa del alcohol C_{28} fueron los resultados que permitieron determinar la influencia de cada parámetro, en ocho experimentos independientes con tres réplicas cada uno mediante un diseño experimental de Youden-Steiner (6, 10, 11). Los efectos sobre las medias mostraron (Tabla 1) que ninguno de los cambios realizados sobre los siete parámetros estudiados afectó los resultados (Tabla 2), al ser éstos inferiores al límite de aceptación exigido ($\sqrt{2} \times \text{DE}$), por lo que se puede afirmar que el método resultó robusto ante los cambios operacionales efectuados.

Tabla 1. Resultados promedio por experimento.

Resultado	Experimento							
	1	2	3	4	5	6	7	8
P(mg)	18,47	18,59	18,58	18,61	18,55	18,58	18,49	18,55
DE	0,17	0,21	0,10	0,13	0,21	0,14	0,15	0,15
$t_{C_{28},C_{30}}$	2,83	2,71	2,65	2,52	2,43	2,74	2,58	2,98
$R_{C_{28},C_{30}}$	6,42	6,96	7,15	6,90	6,94	7,05	7,35	6,84

P (mg): Masa total de alcoholes, DE: Desviación estándar,

$t_{C_{28},C_{30}}$: Retención relativa para el C28, y $R_{C_{28},C_{30}}$: resolución entre los alcoholes C28 y C30.

Tabla 2. Efecto de los cambios operacionales sobre los resultados de las medias en el ensayo de robustez.

Cambio operacional	Retención relativa (C_{28}, C_{20})	Resolución ($C_{28}-C_{30}$)	Masa total de alcoholes (mg)	DE*
Temperatura del inyector	0,01	0,19	0,02	0,01
Temperatura del detector	0,01	0,22	0,01	0,05
Flujo de gas portador	0,12	0,03	0,06	0,00
Gradiente de temperatura	0,19	0,12	0,05	0,02
Temperatura inicial del horno	0,24	0,17	0,01	0,03
Temperatura final del horno	0,02	0,35	0,01	0,01
Volumen de inyección	0,02	0,04	0,03	0,02
x DE	0,25	38,00	0,07	0,06

*DE: Desviación estándar.

CONCLUSIONES

El método analítico propuesto para la determinación del contenido de los alcoholes de alto peso molecular que determinan la identidad y pureza del policosanol ingrediente activo, cumplió con los requerimientos para considerarse validado, demostrando ser lineal, exacto, preciso, selectivo y robusto. De esta manera el método puede ser utilizado en el proceso de control de calidad y estudios de estabilidad de este ingrediente activo.

BIBLIOGRAFÍA

1. A. Laguna, J. Magraner, D. Carvajal, M. L. Arruzazabala, R. Más, y M. García, A mixture of higher primary aliphatic alcohols, its obtention from sugar cane wax and its pharmaceutical uses, USA Patent 5,856,316 (1993).
2. R. Más, Policosanol, *Drugs of the Future*, 25, 569 (2000).
3. S. Fernández, R. Más, R. Gámez, A. Díaz, J. C. Fernández, S. D. Orta, J. Illnait, G. Cataño, S. Mendoza, F. Valdés, E. Álvarez *et al.*, A pharmacological surveillance of policosanol tolerability in the elderly, *Am Am J Geriatr Pharmacother*, 2, 219 (2004).
4. V. L. González y J. Magraner, Metodología analítica por CG para la determinación de los alcoholes alifáticos que componen el policosanol, *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 29, 123 (1998).

5. V. González, J. Magraner, T. Otero y E. García, Validación y estudio interlaboratorios de una nueva metodología analítica por CG para la determinación de policosanol en la materia prima. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, **30**, 148 (1999).
6. V. L. González y J. Magraner, Validation of a gas chromatographic method for the determining fatty alcohols that compose policosanol in 5 mg film-coated tablets, *J. AOAC Int*, **82**, 834 (1999).
7. R. T. Wiedemer, S. L. Mckinley y T. W. Rendl, Advantages of wide-bore capillary columns, *American Laboratory*, **1**,1 (1986).
8. Supelco Inc., GC Bulletin 814B. High Efficiency and large sample capacity in packed column or capillary column gas chromatographs, 1-10 (1988).
9. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Methodology Q2B, 1996.
10. M. Castro, S. Gascon, M. Pujol, J. M. Sans y L. Vicente, "Validación de métodos analíticos", A.E.F.I., Sec. Catalana, España, 1989.
11. W. J. Youden y E. H. Steiner, "Statistical Manual of the AOAC", AOAC, Arlington, VA, 1975.