

Identificación por Cromatografía de Gases - Espectrometría de Masas y determinación cuantitativa por Cromatografía de Gases de los productos de degradación térmica de las tabletas de policosanol (20 mg) revestidas.

Víctor L. González Canavaciolo, Roxana de la C. Sierra Pérez, David Marrero Delange, Virgen Milián Hernández y Heriberto Campaña Castellanos.

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Calle 198 entre Avenidas 19 y 21, Atabey, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: cpn@cnic.edu.cu

Recibido: 11 de agosto de 2006. Aceptado: 18 de diciembre de 2006.

Palabras clave: tabletas de policosanol, productos de degradación, CG-EM, validación.
Key words: policosanol tablets, degradation products, GC-MS, validation.

RESUMEN. Mediante Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas se identificaron los estearatos y palmitatos de hexacosanilo, octacosanilo y triacontanilo como los principales productos de degradación térmica en las tabletas de policosanol de 20 mg de ingrediente activo. Para cuantificar estos productos de degradación se desarrolló y validó una metodología por cromatografía de gases con detector de ionización por llama, utilizando una columna capilar *wide-bore* BPX-5 (25 m X 0,53 mm d.i. X 1,0 μm de espesor de película) y estearato de docosanilo como patrón interno, mediante un programa de temperatura entre 300 y 350 °C. Al validar la metodología, esta mostró buena exactitud y linealidad en un intervalo entre 2,5 y 30 % de degradación del ingrediente activo. Los estudios de precisión realizados a este método (repetibilidad y precisión intermedia) mostraron coeficientes de variación menores del 2 % en el análisis de tabletas con un 7,2 % de degradación. Los límites de detección y cuantificación encontrados para el palmitato de hexacosanilo, uno de los ésteres minoritarios de la mezcla, (0,006 y 0,022 mg/tableta, respectivamente) demostraron la posibilidad de emplear esta metodología para el análisis de tabletas con menos de un 2 % de degradación, además de obtener buena precisión y recobrado en el análisis de tabletas contaminadas con palmitato de hexacosanilo en una concentración correspondiente al límite de cuantificación. El método puede ser utilizado como soporte en los estudios de estabilidad de dichas tabletas.

ABSTRACT. Identification of hexacosanyl, octacosanyl, and triacontanyl stearates and palmitates as main thermal degradation products of policosanol in film-coated tablets containing 20 mg of this active ingredient was achieved by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. In order to quantify these degradation products, a Gas Chromatographic method with flame ionisation detector, and docosanyl stearate as internal standard was developed and validated. In this method it was used a BPX-5 wide-bore capillary column (25 m X 0.53 mm d.i. X 1.0 μm of film thickness) in a temperature program from 300 to 350 °C. Validation of the method showed that it is accurate and linear in a range from 2.5 to 30 % of degradation. Precision studies of this method: repeatability and intermediate precision, assayed with tablets degraded in a 7.2 %, showed coefficients of variation lower than 2 %. Determined limits of detection and quantification (0.006 and 0.022 mg, respectively), determined for hexacosanyl palmitate, one of the minority degradation products, prove that the method can be used even for tablets with less than 2 % of degradation. Good accuracy and precision were obtained when tablets spiked with concentrations of hexacosanyl palmitate that correspond to the quantification limit were analyzed. The method is suitable in support of stability studies of these tablets.

INTRODUCCION

El policosanol es un ingrediente activo hipolipemiante y antiplaquetario¹⁻³ compuesto por una mezcla de alcoholes alifáticos primarios de alto peso molecular. Su componente principal es el 1-octacosanol (C_{28}), seguido por el 1-triacontanol (C_{30}), el 1-hexacosanol (C_{26}) y otros alcoholes de alto peso molecular.⁴

La determinación de los productos de degradación del policosanol en sus formas terminadas debe ser realizada como apoyo a los estudios de estabilidad, según se requiere actualmente por la Industria Farmacéutica para los productos nuevos.⁵ Estudios realizados bajo condiciones drásticas de almacenamiento a las tabletas de policosanol, con dosis de 5 y 10 mg, mostraron que a elevadas temperaturas aparecen productos de degradación. Estos fueron identificados por Cromatografía de Gases (CG) acoplada a Espectrometría de Masas (EM) como los palmitatos y estearatos de octacosanilo y triacontanilo en las tabletas de 5 mg, y como los palmitatos de hexacosanilo, octacosanilo y triacontanilo y los estearatos de hexacosanilo, octacosanilo y triacontanilo en las tabletas de 10 mg y se desarrollaron métodos analíticos para su determinación por CG en dichas formas farmacéuticas.^{6,7}

No obstante, en el desarrollo farmacéutico ulterior del policosanol

también se ha evidenciado la formación de productos de degradación térmica en la más reciente forma terminada, la tableta recubierta con dosis de 20 mg. Esto explica la necesidad de identificar los productos de degradación de esta nueva formulación, así como de desarrollar y validar una nueva versión del método analítico que permita apoyar sus estudios de estabilidad.

MATERIALES Y METODOS

Disoluciones

Se emplearon disoluciones patrones de referencia (DPR) de palmitatos de hexacosanilo (96,59 %), octacosanilo (97,72 %) y triacontanilo (97,27 %), así como de estearatos de hexacosanilo (99,57 %), octacosanilo (99,29 %) y triacontanilo (96,48 %) (CNIC, Ciudad de La Habana, Cuba)⁸ a 0,5 mg/mL en n-hexano (Merck, Alemania). Se empleó una disolución de patrón interno (DPI) de estearato de docosanilo (99,9 %) (CNIC, Ciudad de La Habana, Cuba)⁸ también a 0,5 mg/mL en n-hexano (Merck, Alemania). Se preparó, además, una disolución patrón de trabajo (DPT), también en n-hexano, con la composición siguiente: palmitato de hexacosanilo a 0,13 mg/mL; palmitato de octacosanilo a 1,2 mg/mL; palmitato de triacontanilo a 0,32 mg/mL; estearato de hexacosanilo a 0,01 mg/mL; estearato de octacosanilo a 0,77 mg/mL y estearato de triacontanilo a 0,17 mg/mL. Se empleó también N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA, Sigma, EUA) como agente derivatizante para los alcoholes del policosanil.

Equipos

Se empleó un cromatógrafo de gases modelo GC 14B (Shimadzu, Japón) con detector de ionización por llama, acoplado a un sistema de cómputo, y equipado con una columna capilar con fase enlazada BPX-5 (25 m X 0,53 mm d.i. X 1,0 μ m de espesor de película, SGE, Australia). Programación: de 300 a 350 °C a 10 °C/min y 10 min isotérmico a la temperatura final. Flujo del gas portador (hidrógeno): 13,2 mL/min. Para la formación de la llama se empleó hidrógeno a 40 mL/min y aire a 400 mL/min. El detector y el inyector se calentaron a 350 °C. El volumen de inyección fue 1 μ L.

Se empleó un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas GC 8000 Series MD800 (Fisons Instruments, Inglaterra), con un sistema de cómputo y equipado con una columna capilar SPB-5

(25 m X 0,32 mm d.i. X 0,25 μ m de espesor de película, Supelco, USA). Programación: de 100 a 200 °C a 40 °C/min, de 200 a 320 °C a 10 °C/min y 30 min isotérmico a la temperatura final. El flujo de gas portador (helio) fue 1 mL/min. Las temperaturas del inyector, la fuente y la interfase fueron 300, 250 y 300 °C, respectivamente. La energía de ionización fue de 70 eV. El espectro de masas se obtuvo de forma continua de 40 a 800 m/z.

Degradación de las tabletas

Se tomaron aleatoriamente 60 tabletas, seleccionadas a partir de tres lotes (20 tabletas de cada uno), las cuales fueron sometidas a degradación acelerada por termólisis, a 108 °C durante 24 h en una estufa con temperatura controlada.

Preparación de la muestra

Se tomaron aleatoriamente 20 tabletas degradadas, se pesaron y se les determinó el peso promedio, que oscila alrededor de 176 mg. Se trituraron en el mortero hasta obtener un polvo fino y homogéneo. En un tubo de ensayos se pesó, con una exactitud de 0,1 mg, alrededor del peso promedio de la tableta, se le añadieron 3 mL de la DPI. Se calentó a 60 °C, con agitación ocasional, durante 15 min. Se filtró en caliente por un papel de filtro (Whatman No. 1; Maidstone, UK), una alícuota de 500 μ L y se transfirió a un vial de 1,8 mL, al que se adicionaron 50 μ L de MSTFA. Se calentó durante 15 min a 60 °C para derivatizar los alcoholes del ingrediente activo, con lo cual se evitan adsorciones irreversibles de estos alcoholes en el sistema cromatográfico y se analizó por CG. Las masas correspondientes a los productos de degradación se obtuvieron por el método del Patrón Interno de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$M(i) = \frac{A(i) \cdot M(PI) \cdot f_i^m}{A(PI)}$$

donde:

M(i) masa del compuesto i (mg);
A(i) área del compuesto i;
M(PI) masa del patrón interno (mg);
A(PI) área del patrón interno
 f_i^m factor másico de respuesta relativa.

Para la determinación de los factores másicos de respuesta relativa (f_i^m), 0,2 mL de cada DPR se transfirieron a un vial de 1,8 mL, se evaporó a sequedad el contenido a 60 °C en corriente de aire y se le añadieron 0,2 mL de la DPI. La disolución resultante se calentó a 60 °C duran-

te 10 min (n = 3), porciones de 1 mL fueron analizadas por CG, y los f_i^m fueron calculados mediante la ecuación siguiente:

$$f_i^m = \frac{A(PI) \cdot m(i)}{A(i) \cdot m(PI)}$$

Debido a la coelución del palmitato de octacosanilo con el estearato de hexacosanilo, así como del palmitato de triacontanilo con el estearato de octacosanilo, los f_i^m de estos dos pares de ésteres se determinaron al considerar tanto la suma de las áreas como de las masas añadidas, de esta manera, se determinó, de forma conjunta, la masa total de los compuestos que co-eluyen como la sumatoria de sus masas respectivas. La masa total de los productos de degradación en las tabletas se calculó por la sumatoria de las masas individuales de todos los analitos determinados por CG: los palmitatos y estearatos de hexacosanilo, octacosanilo y triacontanilo. Este resultado se corrigió teniendo en cuenta la masa de la muestra y la masa promedio de las tabletas analizadas.

Validación del método

La precisión se determinó a través de los CV (%) obtenidos en el estudio de repetibilidad (un analista en el mismo día y equipo, n = 8) y en el estudio de precisión intermedia (dos analistas en diferentes equipos, durante tres días, n = 3). Para comprobar si había diferencias significativas entre los resultados se aplicaron las pruebas F de Fisher y t de Student para p = 0,05. Los CV fueron evaluados según el criterio de Horwitz.⁹

Para el estudio de linealidad y exactitud se tomaron tabletas de 20 mg de policosanil sin degradar y se contaminaron con las masas de ésteres correspondientes a 2,5; 5; 10; 20 y 30 % de degradación (0,25; 0,5; 1,0; 2,0 y 3,0 mL de la DPT). Las muestras se evaporaron a sequedad en corriente de aire y se continuó con el procedimiento analítico descrito anteriormente (n = 3). La regresión lineal se obtuvo por el método de los mínimos cuadrados, para lo cual, se consideraron las masas encontradas (y) en función de las masas añadidas (x). Los criterios de aceptación para la linealidad fueron: coeficiente de correlación (r) > 0,99; coeficiente de variación de los factores de respuesta (CV_p) < 5 %; coeficiente de variación de la pendiente (CV_p) < 2 % y la inclusión del cero en los límites de confianza del inter-

cepto para $p = 0,05$. La exactitud se estudió mediante el recobrado en los cinco puntos del estudio de linealidad. Cada recobrado promedio se comparó con el 100 % mediante una prueba t de Student. La hipótesis nula (no existen diferencias significativas entre el recobrado promedio y el 100 %) se aceptó para $p = 0,05$. Las t experimentales se calcularon según:

$$t = \frac{|100 - \text{recobrado promedio}| \sqrt{n}}{CV}$$

Los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) se determinaron por sucesivas diluciones de una muestra de concentración conocida. Se consideraron los LD y LC como tres y diez veces la relación señal/ruido, respectivamente. Se determinó además, el recobrado y el coeficiente de variación del método en el LC mediante el análisis de una muestra preparada con la concentración correspondiente a dicho límite ($n = 6$).

RESULTADOS Y DISCUSION

Identificación de los productos de degradación

Las tabletas con dosis de 20 mg de policosanol, sometidas a condiciones de estrés, mostraron la aparición de cuatro picos extras al ser analizadas por CG, lo que indicó la ocurrencia de un proceso de degradación (Fig. 1). Se observó que las

condiciones cromatográficas empleadas permiten la separación de los componentes del ingrediente activo, con tiempos inferiores a los 3 min y de los productos de degradación, entre 4 y 8 min. Dados los mayores tiempos de retención observados para los productos de degradación, estos no interfieren con los componentes del ingrediente activo ni con el patrón interno utilizado.

Como se puede apreciar, el presente método permite el análisis de los productos de degradación del policosanol en menos de 10 min, tiempo muy inferior al requerido por las metodologías anteriores.^{6,7} Esto fue posible gracias al uso de la columna capilar con fase enlazada seleccionada, la cual, además de mayor resolución, inercia, y estabilidad química, permite el calentamiento a temperaturas superiores a las empleadas en las versiones anteriores de este método, lo que aumenta significativamente la velocidad de los análisis.

Los productos de degradación formados fueron identificados por CG-EM como: (1) palmitato de hexacosanilo, (2) una mezcla de palmitato de octacosanilo y estearato de hexacosanilo, (3) una mezcla de estearato de octacosanilo y palmitato de triacontanilo y (4) estearato de triacontanilo. La identificación se realizó por comparación de los espectros obtenidos con los de compuestos similares de la espectroteca

NIST y con los espectros obtenidos para los patrones sintetizados.

La formación de estos productos de degradación térmica puede deberse a la interacción del excipiente estearato de magnesio, compuesto por una mezcla de estearato y palmitato de magnesio,¹⁰ con los alcoholes del policosanol. La presencia mayoritaria de los alcoholes de 26, 28 y 30 átomos de carbono en el policosanol hace que los ésteres correspondientes a estos alcoholes sean los que se formen en mayor proporción.

La co-elución de los pares de compuestos identificados en los picos 2 y 3 fue corroborado por comparación con los cromatogramas de las disoluciones de referencia individuales (Fig. 1). En ninguno de los dos casos fue posible separar estos pares de ésteres, pues la igualdad de sus masas moleculares y el hecho de pertenecer al mismo grupo químico, los hace presentar comportamientos cromatográficos muy similares.

Para realizar los estudios de linealidad y exactitud se hizo necesario preparar una disolución patrón de trabajo (DPT), con los patrones sintetizados, en una proporción similar a la que estos presentan en la tableta degradada: 4,91 % de palmitato de hexacosanilo; 44,77 % de palmitato de octacosanilo; 3,36 % de estearato de hexacosanilo; 12,02 % de palmitato de triacontanilo; 28,69 % de

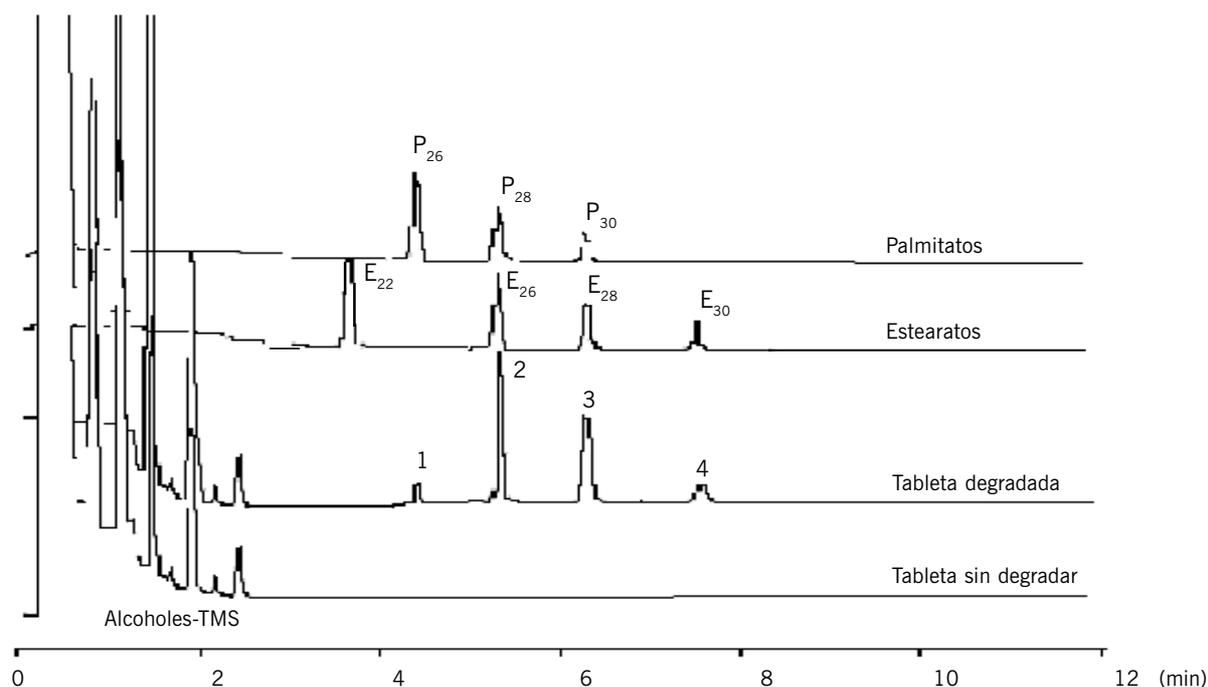


Fig. 1. Cromatograma gaseoso capilar de las tabletas de 20 mg de policosanol sin degradar, degradadas y los patrones de referencia de ésteres. Estearato de docosanilo (E_{22}). 1) Palmitato de hexacosanilo (P_{26}). 2) Mezcla de palmitato de octacosanilo (P_{28}) y estearato de hexacosanilo (E_{26}). 3) Mezcla de palmitato de triacontanilo (P_{30}) y estearato de octacosanilo (E_{28}). 4) Estearato de triacontanilo (E_{30}). Las señales entre 0,5 y 3 min corresponden a los alcoholes-TMS.

estearato de octacosanilo y 6, 25 % de estearato de triacontanilo. Para conocer esta proporción, y debido a la coelución de algunos de los ésteres de interés, se combinó el análisis por CG de muestras de tabletas de gradadas con el de muestras sintetizadas por reacción de los alcoholes patrones individuales con la mezcla de palmitato y estearato de magnesio que forma el excipiente.

Validación del método de cuantificación

En el estudio de precisión se obtuvo un contenido total de ésteres de 1,94 mg/tableta, lo cual se corresponde con un 7,26 % de degradación de los alcoholes que componen el ingrediente activo (Tabla 1). Tanto para la repetibilidad como para la precisión intermedia se obtuvieron $CV < 2\%$ los que se encuentran dentro de los límites de aceptación establecidos por Horwitz (4 %) teniendo en cuenta el porcentaje del analito en la muestra.⁹ Se realizaron, además, los correspondientes análisis estadísticos, según los cuales, no hubo diferencias significativas entre los resultados de ambos analistas, siendo las F y t experimentales obtenidas (1,306 y 2,128; respectivamente) inferiores a las tabuladas.

La ecuación de regresión obtenida al analizar tabletas contaminadas con cantidades de ésteres que simulaban degradaciones entre el 2,5 y el 30 % fue:

$$y = (1,001 \pm 0,007) x - (0,00 \pm 0,03),$$

con intervalos de confianza calculados para $p = 0,05$. El coeficiente de correlación ($r = 0,9999$), el coeficiente de variación de los factores de respuesta ($CV_f = 1,11\%$), el coeficiente de variación de la pendiente ($CV_b = 0,37\%$) y el intervalo de confianza del intercepto incluyó el cero, por lo que la línea de regresión pasa por el origen del eje de coordenadas. Todos estos resultados prueban la linealidad del método.

Los recobrados obtenidos estuvieron entre 99,32 y 100,83 %, con $CV < 2\%$ (Tabla 2). Estos fueron comparados con el 100 % y no se encontraron diferencias significativas de acuerdo con las t experimentales, las que fueron inferiores a la t crítica tabulada para $p = 0,05$ (4,303), con lo que queda probado que el método es exacto.

Los LD y LC (0,006 y 0,022 mg/tableta, respectivamente) fueron determinados para el palmitato de hexacosanilo por ser uno de los productos de degradación minoritarios y no co-eluir con otros compuestos.

El análisis de las tabletas contaminadas con la DPR de este éster en una cantidad correspondiente al LC (lo que representa un 1,67 % de degradación), permitió cuantificarlo con un recobrado de 98,74 % y un $CV = 4,62\%$ ($n = 6$). De acuerdo con la t experimental (0,668), la cual fue inferior a la t tabulada (2,571), no hubo diferencias significativas entre la cantidad añadida y la determinada y el CV fue inferior al límite establecido por Horwitz (5,7 %).⁹ Teniendo en cuenta los resultados anteriores se puede considerar que la determinación en el LC se realiza con exactitud y precisión adecuadas.

CONCLUSIONES

Se identificaron los productos de degradación térmica de las tabletas revestidas con dosis de 20 mg de policosanol como los palmitatos de hexacosanilo, octacosanilo y triacontanilo, y los estearatos de hexacosanilo, octacosanilo y triacontanilo. Se desarrolló y validó una metodología analítica por CG con columna capilar, la cual resultó lineal, exacta, precisa y con adecuados límites de detección y cuantificación, por todo lo cual puede ser utilizada en la determinación de estos compuestos en las tabletas degradadas como apoyo a los estudios de estabilidad.

BIBLIOGRAFIA

1. Castaño G., Más R., Fernández L., Ilnait J. and Fernández J.C., Comparison of two regimens of policosanol administered at 20 mg/d in patients with type II hypercholesterolemia: A randomized,

- double-blind, Placebo-controlled study. **Curr. Ther. Res.**, **62**, 194-208, 2001.
2. Castaño G., Más R., Fernández L., Ilnait J., Gámez R. and Alvarez E., Efecto de policosanol 20 vs. 40 mg/d in the treatment of patients with type II hypercholesterolemia: A 6 months double-blind study. **Int. J. Clin. Pharmacol. Res.**, **XXI**, 43-57, 2001.
3. Arruzazabala M.L., Molina V., Más R., Fernández L., Carvajal D., Valdés S. and Castaño G., Antiplatelet effect of policosanol 20 and 40 mg/d in healthy volunteers and dyslipidemic patients. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, **29**, 891-7, 2002.
4. Laguna A., Magraner J., Carvajal D., Arruzazabala M.L., Más R. and García M., C. Patent 22229, USA 5 663, 156, and USA 5856, 316.
5. ICH3AQ12a: *Impurities in new medicinal products*, London, December, 1996.
6. Sierra R., González V.L., Tejada Y., Campaña H. y Milian V., Determinación por cromatografía gaseosa de los productos de degradación térmica de las tabletas con 10 mg de policosanol, **Acta Farm. Bonaerense**, **24**, 99-103, 2005.
7. González V., 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.
8. Leilani A., Campaña H., Milian V., Loupy A. and Petit A., Patente Cubana 22679, Procedimientos de Preparación en ausencia de disolventes y bajo irradiación por microondas, 2001.
9. Horwitz W., Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs **J. AOAC**, **65**, 525-530, 1982.
10. United States Pharmacopeia and National Formulating (USP 26/NF21), 2003.

Tabla 1. Resultados del estudio de precisión.

Estudio de precisión	Media \pm tDe ^a (mg/tableta)	CV (%)
Repetibilidad (n = 8)	1,94 \pm 0,05	1,19
Precisión intermedia (3 d, n = 3)		
Analista 1	1,93 \pm 0,08	1,80
Analista 2	1,81 \pm 0,08	1,82

^a $t(0,05; 7) = 2,365$; $t(0,05; 8) = 2,306$

Tabla 2. Resultados del estudio de exactitud para el total de ésteres (n = 3)

Cantidad añadida (mg)	Cantidad encontrada (mg)	Recobrado promedio (%)	t_{exp}
0,16	0,17	100,83	0,885
0,84	0,84	100,02	0,052
1,67	1,66	99,32	1,107
4,20	4,24	100,88	0,958
8,34	8,35	100,05	0,076