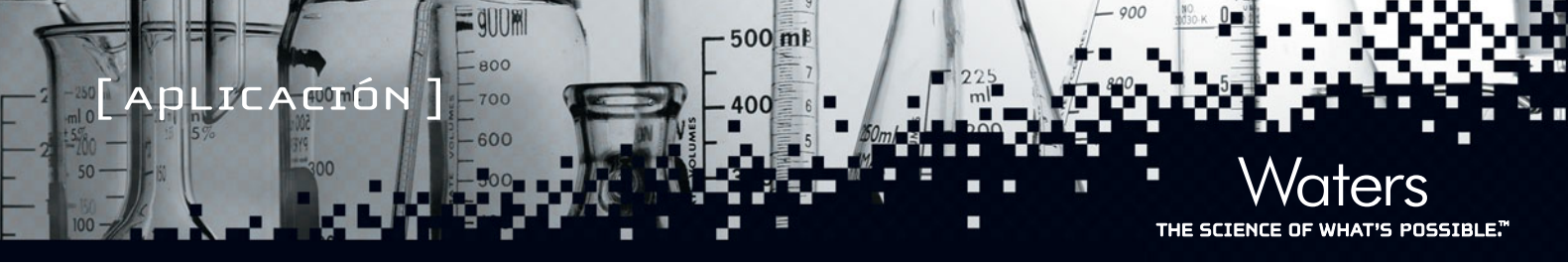

TRANSFERENCIA DEL ENSAYO USP PARA SIMVASTATINA A UPLC

Paul Rainville y Robert Plumb
Waters Corporation, Milford, MA, USA

INTRODUCCIÓN

La simvastatina (Figura 1) es un agente para reducir lípidos, que se deriva sintéticamente a partir de un producto de la fermentación de *Aspergillus terreus*. Tras la ingestión oral, la simvastatina (una lactona inactiva) es hidrolizada a la forma b-hidroxiácida correspondiente, que es un inhibidor de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa. Dicha enzima cataliza la conversión de HMG-CoA a mevalonato. Este es un paso inicial y limitante en la biosíntesis del colesterol.

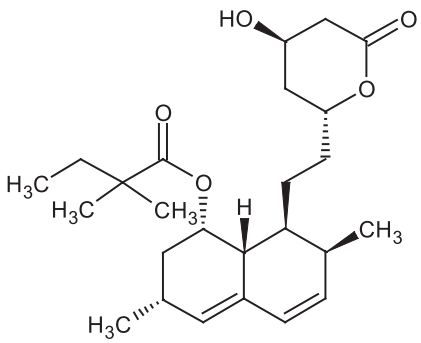

Figura 1: Estructura química de la simvastatina.

La simvastatina se suele administrar por vía oral, en un comprimido que puede contener 5, 10, 20, 40 u 80 mg del ingrediente farmacéutico activo (simvastatina) y los siguientes ingredientes inactivos: celulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, óxidos de hierro, lactosa, estearato de magnesio, almidón, talco, dióxido de titanio y otros ingredientes. Como conservante se añade hidroxianisol butilado.

La prueba de uniformidad de contenido para la simvastatina se realiza mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con detección ultravioleta (UV). De la rapidez en la realización de esta prueba depende la aprobación del producto terminado y la obtención de ingresos. Para el ensayo actual de monografía USP 30–NF 25 para comprimidos de simvastatina se precisa el uso de un cromatógrafo de líquidos equipado con un detector de absorbancia a 238 nm y una columna de 4,6 mm x 25 cm, empaquetada con material L1 mantenido a una temperatura de 45 °C, y utiliza un caudal de aproximadamente 1,5 mL por minuto. Se exige para la separación un factor de capacidad, k´, de no menos de 3,0. La eficacia de la columna no debe ser inferior a 4500 platos teóricos, con un factor de asimetría de no más de 2,0 y una desviación estándar relativa para inyecciones replicadas de no más del 2,0%. El análisis actual basado en HPLC necesita un tiempo de análisis de 12 minutos, con un tiempo de retención de 9,28 minutos para el ingrediente activo, simvastatina.

La UltraPerformance LC® es una nueva categoría de ciencia de separación que aprovecha principios bien establecidos de cromatografía líquida usando partículas porosas de tamaño inferior a los 2 µm. Estas partículas funcionan a velocidades lineales elevadas de fase móvil para producir separaciones rápidas con sensibilidad y resolución mayores. Por consiguiente, la tecnología UPLC® permite reducir notablemente los tiempos de análisis, a la par que satisface los criterios de aceptación del ensayo basándose en el número de platos, la resolución y la retención del analito. En esta Application Note demostramos la forma en que el ensayo HPLC para la simvastatina se ha transferido a UPLC. El análisis UPLC se compara con los criterios de prueba de la USP en cuanto a rendimiento y calidad.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Se preparó una solución estándar de simvastatina de acuerdo con la metodología USP, diluyéndose luego a 100 µg/mL para proceder al análisis cromatográfico.

Condiciones de HPLC

Sistema de LC:	Sistema ACQUITY UPLC®
Columnas:	XBridge™ C_{18} 4,6 x 250 mm, 5 µm
Fase móvil:	Acetonitrilo al 65%/tampón fosfato al 35% - pH 4,5
Caudal:	1,5 mL/min
Volumen de inyección:	10 µL
Temperatura:	45 °C
Detección:	ACQUITY UPLC PDA a 238 nm

TRANSFERENCIA DEL ENSAYO USP PARA SIMVASTATINA A UPLC

Condiciones de UPLC

Sistema de LC:	Sistema ACQUITY UPLC
Columna:	ACQUITY UPLC BEH C_{18}
	2,1 x 100 mm, 1,7 µm y
	2,1 x 30 mm, 1,7 µm
Fase móvil:	Acetonitrilo al 65% /fase acuosa al 35%
Caudal:	0,56 mL/min
Volumen de inyección:	0,8 µL
Temperatura:	45 °C
Detección:	ACQUITY UPLC PDA a 238 nm

RESULTADOS Y COMENTARIOS

La Figura 2 presenta la separación de la simvastatina por HPLC. Se puede observar que el analito se eluyó con un tiempo de retención de 9,28 minutos. El análisis HPLC generó un valor k´ de 5,5, 12112 platos teóricos según 4σ y un factor de asimetría de 0,94.

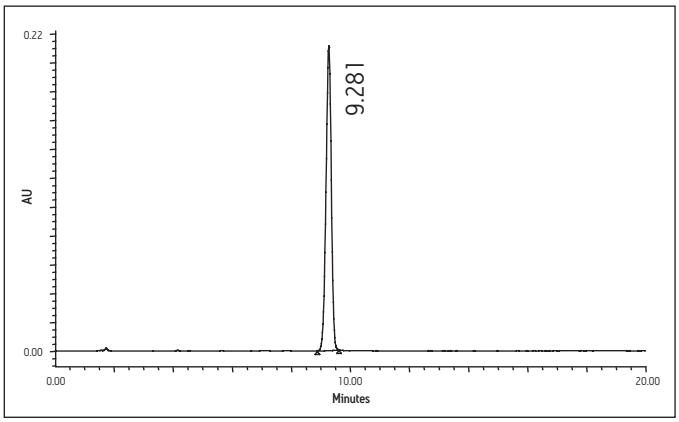

Figura 2: Separación de la simvastatina por HPLC.

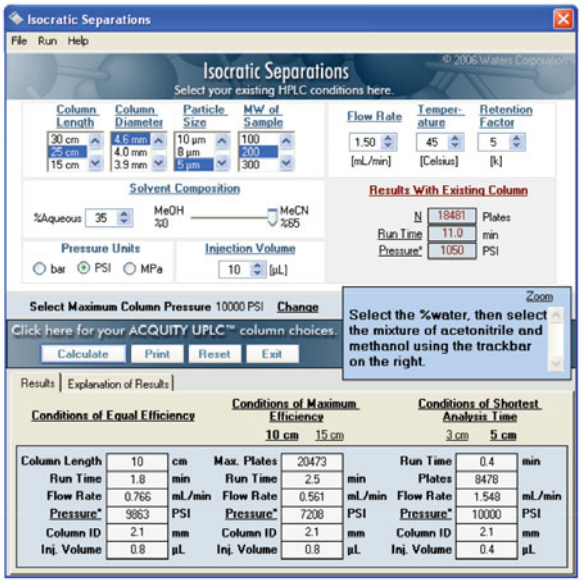

Figura 3: Calculadora de la consola ACQUITY UPLC.

El método HPLC se transfirió a escala a UPLC usando la calculadora de la consola ACQUITY UPLC. Esta calculadora permite que el usuario introduzca las condiciones actuales de HPLC, incluidas la longitud de la columna, la composición de la fase móvil y el caudal. A continuación, la calculadora genera tres resultados: 1.) las condiciones de "Igual Eficacia", 2.) las condiciones de "Máxima Eficacia" y 3.) las condiciones de "Tiempo de análisis más corto". Se introdujeron las condiciones de HPLC para la simvastatina y los resultados obtenidos se presentan en la Figura 3.

Los datos generados muestran tres resultados relacionados con tres condiciones potenciales de UPLC. La calculadora transfiere las condiciones HPLC a UPLC, teniendo en cuenta los cambios en el diámetro de la columna y el tamaño de la partícula al calcular el caudal.Lascondicionesequivalentessecalculanajustandoelcaudalauna proporción de $2{,}1^2/4{,}6^2$ para dar cuenta de la geometría de la columna, y luego se multiplican por la proporción de 5/1,7 para tener en cuenta la reducción en el tamaño de la partícula.

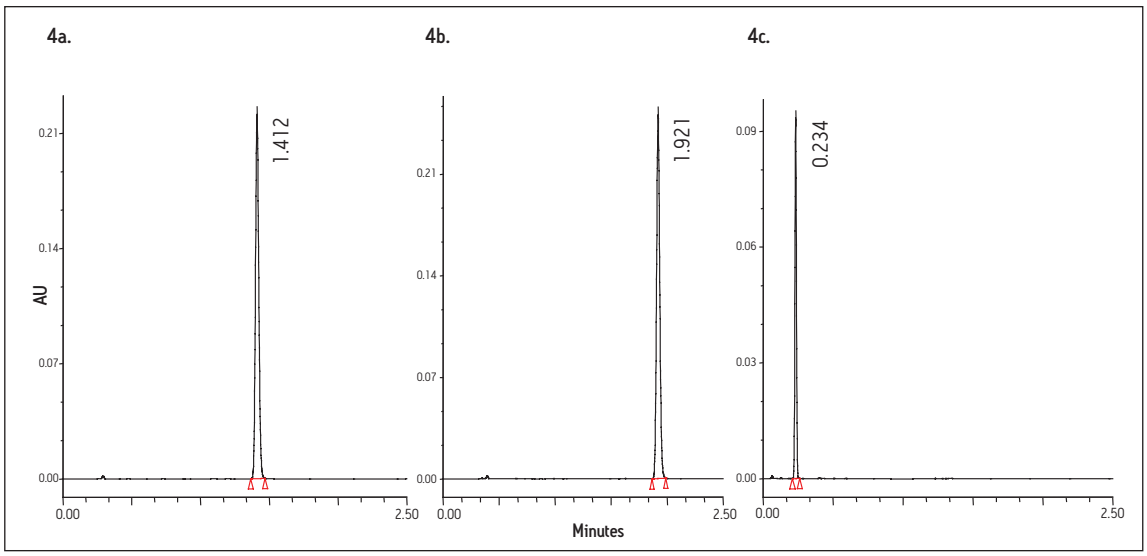

Figura 4: La prueba UPLC de simvastatina usando 4a.) condiciones de eficacia igual, 4b.) condiciones de eficacia máxima y 4c.) condiciones de tiempo más corto de análisis, como sugiere la calculadora de la consola ACQUITY UPLC.

Análisis UPLC

El volumen de inyección se llevó a escala para tener en cuenta el cambio en el volumen total de la columna.

Las condiciones transferidas de eficacia igual sugieren el uso de una columna C_{18} de 2,1 x 100 mm, 1,7 µm, operando a un caudal de 766 µL/min y con un volumen de inyección de 0,8 µL. Como el volumen de inyección era muy bajo, se instaló un bucle de inyección de 2 µL en el inyector automático. Los datos obtenidos a partir del uso de estas condiciones se presentan en la figura 4a.

Los resultados indican un tiempo de análisis de 1,41 minutos. El sistema ACQUITY UPLC presentó una eficacia de 12874, un valor de k´ de 4,88 y un factor de asimetría USP de 1,10. Estos valores se comparan favorablemente con los originales de HPLC, de 12112 para eficacia, 5,5 para k´ y un factor de asimetría de 0,94.

Las condiciones de eficacia máxima precisaron trabajar a un caudal de 560 µL/min y un tiempo de análisis de 1,92 minutos. Los datos obtenidos bajo estas condiciones se presentan a continuación, en la figura 4b. Aquí podemos observar que la retención máxima fue levemente mayor que bajo las condiciones de eficacia igual.

Los cálculos del rendimiento cromatográfico revelaron que la eficacia cromatográfica aumentaba a un valor de 17685, un factor k´ de 5 y un factor de asimetría de 1,10.

Las condiciones de tiempo más corto de análisis se realizaron en una columna C_{18} de 2,1 x 30 mm, 1,7 µm, a un caudal de 1,5 mL/min. Los datos generados se presentan en la figura 4c. Estas condiciones proporcionaron un tiempo de análisis de sólo 0,23 minutos, pero el cálculo de eficacia de esta separación fue inferior a los criterios de aceptación de la USP para esta prueba.

Transferencia de método L/dp

La transferencia del método se logró manteniendo L/dp constante; las condiciones iniciales utilizaron una columna de 250 mm y un tamaño de partícula de 5 µm, dando un valor L/dp de 50 (250/5). Al pasar a una columna C_{18} de 2,1 x 100 mm, 1,7 µm, el valor L/dp aumentó a 59, lo que permitió obtener un sistema de cromatografía más eficaz. No obstante, cuando se empleó la columna C_{18} de 2,1 x 30 mm, 1,7 µm, el valor L/dp se redujo a 29; ésta es la razón por la cual la eficacia cromatográfica no satisfizo los criterios de aceptación de la USP.

TRANSFERENCIA DEL ENSAYO USP PARA SIMVASTATINA A UPLC

Validez del ensayo

El ensayo UPLC seleccionado para el uso y la evaluación fue el que empleaba las condiciones de eficacia igual, ya que daba la productividad mayor, a la par que satisfacía los criterios de aceptación del análisis. Se evaluó la reproducibilidad usando las condiciones desarrolladas por la calculadora de la consola. Los resultados generales se presentan a continuación, en la tabla 1, donde podemos ver que el porcentaje de desviación estándar relativa para esta metodología fue de 0,883 para seis inyecciones replicadas de 0,8 µL del estándar de simvastatina. Estos resultados estuvieron dentro de los criterios de aceptación para la metodología.

NOMBRE DEL PICO: SIMVASTATINA						
	INYECC.	NOMBRE DEL PICO	TR	ÁREA	% ÁREA	ALTURA
1	1	Simvastatina	1,374	388681	100,00	234823
2	2	Simvastatina	1,374	389533	100,00	235199
3	3	Simvastatina	1,374	383973	100,00	231690
4	4	Simvastatina	1,375	380276	100,00	229737
5	5	Simvastatina	1,375	386983	100,00	233379
6	6	Simvastatina	1,375	386800	100,00	233178
MEDIA			1,375	386041		
DESV. EST.			0,000	3410		
% DESV. EST. RELATIVA			0,03	0,833		

Tabla 1: Reproducibilidad del ensayo UPLC de simvastatina usando la metodología de eficacia igual.

CONCLUSIÓN

La metodología HPLC-UV USP para la prueba del medicamento reductor del colesterol, simvastatina, se ha transferido con éxito a un método ACQUITY UPLC. La metodología final redujo el tiempo de análisis de 9,28 minutos de retención del analito con HPLC, a un tiempo de retención de 1,41 minutos con UPLC (un aumento de factor 7 en la productividad). Se usó la calculadora de la consola para guiar fácilmente la metodología de transferencia a ACQUITY UPLC usando partículas inferiores a 2 µm. La calculadora ofreció tres opciones distintas para los métodos UPLC: Condiciones de eficacia igual, eficacia máxima y tiempo más corto de análisis. Los cálculos de eficacia igual dieron una transferencia casi exacta de la separación cromatográfica en comparación con las condiciones HPLC originales. Con las condiciones UPLC iguales y máximas, los criterios de eficacia del ensayo USP, k´ y factor de asimetría fueron cumplidos o excedidos. La reproducibilidad del análisis se determinó usando el método de eficacia igual, y demostró ser inferior al 1% de RSD para seis inyecciones replicadas. Finalmente, el ensayo se transfirió a un método de tiempo más corto de análisis en el sistema ACQUITY UPLC, lo que dio un tiempo de análisis de 0,3 minutos con una retención del analito de 0,23 minutos, dando un factor de aumento de la producción de 40.

Hemos demostrado lo fácil que es hacer la transferencia del método HPLC al UPLC, así como los beneficios que pueden obtenerse en cualquier entorno de laboratorio donde se conceda importancia a factores como el tiempo, la fuente o los ingresos, donde UPLC puede incrementar considerablemente la producción manteniendo resultados de calidad. Al mismo tiempo, cuando los científicos disponen de una variedad de dimensiones de columna ACQUITY UPLC BEH, tienen flexibilidad para ajustar sus separaciones UPLC a sus propios objetivos.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Waters, ACQUITY UPLC, UltraPerformance LC y UPLC son marcas registradas de Waters Corporation. XBridge y The Science of What's Possible son marcas de Waters Corporation. Las marcas restantes pertenecen a sus respectivos propietarios.

©2006-2007 Waters Corporation. Impreso en EE.UU.
Enero de 2007 720001901ES LG-CP

Waters Corporation
34 Maple Street
Milford, MA 01757 EE.UU.
T: +1 508 478 2000
F: +1 508 872 1990
www.waters.com