

CÁLCULO DEL FACTOR DE RESPUESTA RELATIVO (FRR) PARA LAS IMPUREZAS DE CLONIXINATO DE LISINA

¹Pasquini, Eliana; ²Pointner, Ana; ³Dal Mas, Melina; ⁴Vallese, Cristina.

¹⁻⁴ Servicio de Materiales de Referencia, Dirección de Fiscalización y Gestión de Riesgo, Instituto Nacional de Medicamentos; Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica; Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Palabras Clave: Factor de respuesta relativo (FRR) - Impurezas conocidas - Estándares.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La estimación de impurezas por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) acoplada un a detector de arreglo de diodos (DAD) es una metodología de uso frecuente en la industria farmacéutica para el control de ingredientes activos dada su especificidad, selectividad y sensibilidad y por lo tanto es indicativa del perfil de pureza de los principios activos.

Una desventaja que presenta esta metodología es la

necesidad de contar con sustancias de referencia de las impurezas que se desean estimar. Obteniendo el factor de respuesta relativo (FRR) podemos independizarnos de este requerimiento.

El objetivo del trabajo es calcular el FRR de las impurezas conocidas de clonixinato de lisina con el fin de prescindir del uso de estándares en el ensayo de "Estimación de sustancias relacionadas por HPLC".

MATERIALES Y MÉTODOS

A través del estudio por HPLC del comportamiento lineal de cada impureza y del principio activo, se calcularon los FRR para cuatro sustancias relacionadas comparando sus pendientes con la del clonixinato de lisina.

El rango evaluado fue del 50 % al 150 % de la concentración estimada para el principio activo en una solución diluida tomada como referencia. Se prepararon cinco niveles de concentración y tres muestras independientes por nivel para cada analito.

El sistema cromatográfico utilizado se detalla a continuación:

FM: mezcla de solución reguladora de trietilamina pH 3,0 y acetonitrilo.

Columna: C18 - 3 μ m - 15 cm x 4,6 mm.

Flujo: 1 ml/min.

λ : 240 nm.

Temperatura: 40 °C.

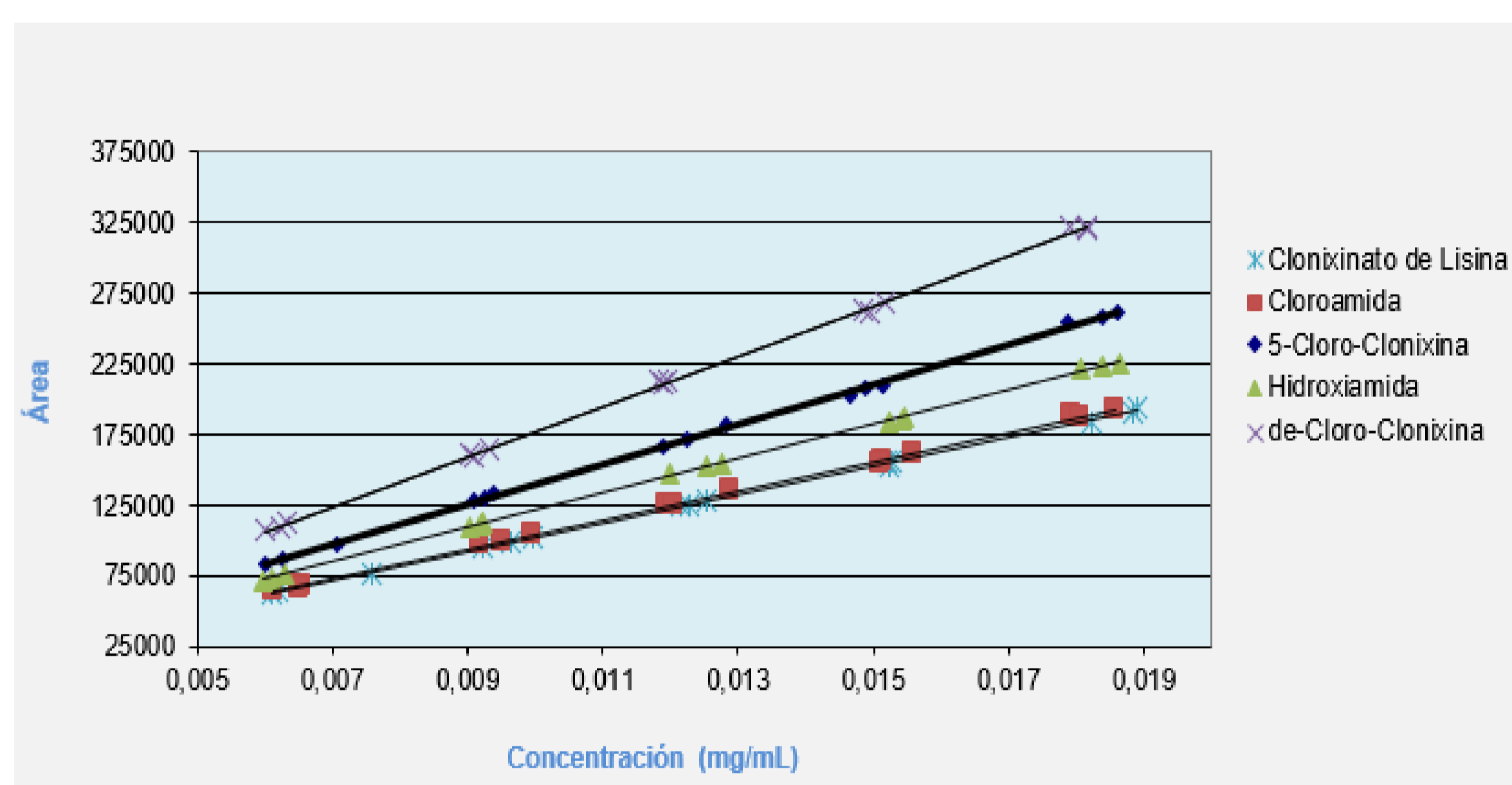
Volumen de inyección: 10 μ L.

Disolventes: 1 = agua : acetonitrilo.

2 = acetonitrilo : trietilamina.

RESULTADOS

Gráfico 1: Área en función de la concentración.



El coeficiente de correlación cuadrático (R^2) obtenido a partir de cada gráfico resultó mayor a 0,997. La distribución de residuos fue aleatoria.

En el análisis estadístico de la pendiente, los valores experimentales de t de Student para cada caso resultaron satisfactorios.

Tabla 2: Comparación de resultados.

Tr	Impureza	Calculado frente a estándar diluido de clonixinato de lisina		Calculado frente a estándar de impurezas
		con FRR	sin FRR	
2,853	de-Cloro-clonixina	0,0066	0,0115	0,0067
3,092	Imp. Desc.	0,0047		0,0038
12,652	Imp. Desc.	0,1182		-
16,244	Hidroxiamida	0,0030	0,0036	0,0025
24,421	5-cloro-clonixina	0,0177	0,0247	0,0193
28,105	Imp. Desc.	0,0125		0,0148

La estimación de impurezas obtenida mediante los dos ensayos dio resultados comparables.

Tabla 1: Análisis de datos obtenidos.

	Clonixinato de Lisina	de-Cloro-Clonixina	Hidroxiamida	Cloroamida	5-Cl-Clonixina
Distribución de residuos	aleatoria	aleatoria	aleatoria	aleatoria	aleatoria
R^2 (0,98 - 1,00)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
R^2 ($> 0,995$)	0,999	0,999	1,000	0,999	0,999
CV% entre FR ($\leq 2,0\%$)	1,08	0,90	0,71	0,93	0,97
Estadística de la pendiente ($t_{exp} > t_{tablas}$)	t_{exp} : 382,3 CUMPLE	t_{exp} : 428,0 CUMPLE	t_{exp} : 443,0 CUMPLE	t_{exp} : 471,7 CUMPLE	t_{exp} : 395,1 CUMPLE
	IC = NO pasa por el cero - CUMPLE	IC = NO pasa por el cero - CUMPLE	IC = NO pasa por el cero - CUMPLE	IC = NO pasa por el cero - CUMPLE	IC = NO pasa por el cero - CUMPLE
Test de proporcionalidad ($t_{exp} < t_{tablas}$)	t_{exp} : 0,88 CUMPLE	t_{exp} : 0,23 CUMPLE	t_{exp} : 0,62 CUMPLE	t_{exp} : 0,11 CUMPLE	t_{exp} : 1,07 CUMPLE
	IC = pasa por el cero CUMPLE	IC = pasa por el cero CUMPLE	IC = pasa por el cero CUMPLE	IC = pasa por el cero CUMPLE	IC = pasa por el cero CUMPLE
Test Cochran ($R < \text{valor crítico}$)	$R = 0,43083$ CUMPLE	$R = 0,30014$ CUMPLE	$R = 0,42477$ CUMPLE	$R = 0,48014$ CUMPLE	$R = 0,65912$ CUMPLE
Factor de respuesta relativo (FRR)	-	1,75	1,21	1,02	1,40

t_{tablas} = t de Student (13; α : 0,05) = 1,7709

Valor crítico Cochran ($n=3$; $r=5$ y α : 0,05) = 0,6838

Al aplicar el test de proporcionalidad los t de Student obtenidos cumplieron con los requisitos.

El estadístico de Cochran, calculado para todos los casos, demostró que las varianzas son homogéneas siendo válidos los modelos propuestos.

CONCLUSIÓN

La aplicación de los FRR de las impurezas conocidas permitió independizarse del uso de estándares y optimizar los recursos involucrados en el análisis.

Este procedimiento podría extenderse a la estimación de sustancias relacionadas de otros ingredientes activos.

BIBLIOGRAFÍA

¹ United States Pharmacopeial and National Formulary (USP 42- NF 37). <1125> Validation of compendial procedures; 2019.

² United States Pharmacopeial and National Formulary (USP 42- NF 37). <1210> Statistical tools for procedures validations; 2019.

³ Farmacopea Argentina 7ma edición. <1130> Validación de métodos analíticos; 2003.

⁴ ICHQ2(R1). Validation of analytical procedures; 2005.

⁵ Asociación española de farmacéuticos de la industria. Validación de métodos analíticos, Capítulo 3, Linealidad y rango; 2001.

Correo electrónico de contacto sr@anmat.gov.ar