

# Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de isotretinoína en cápsulas blandas por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)

## Development and validation of analytical method for determination of isotretinoin in soft capsules by reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)

MABEL PADRÓN, MARÍA EUGENIA AVILÁN, MIRIAM REGNAULT\*

### Resumen

La isotretinoína (ácido-13-cis-retinoico) es el isómero sintético de la Tretinoína, retinoide derivado de la vitamina A. Fue desarrollada por Laboratorios Roche y se comenzó a comercializar en el año 1982, lo que constituyó un gran avance en el tratamiento del acné. El compuesto sintético provee un beneficio terapéutico superior a la vitamina A produciendo menos efectos secundarios y es utilizado en el tratamiento de enfermedades dermatológicas serias, tales como el acné quístico recalcitrante y otros desórdenes de la queratinización (queratosis folicular, ictiosis lamelar y pitiriasis *Rubra pilaris*). La isotretinoína oral se encuentra registrada en el mercado nacional en concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 40 mg encontrándose disponible con diferentes nombres comerciales. El presente trabajo describe el desarrollo de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa con detección de arreglo de diodos capaz determinar simultáneamente los retinoides isotretinoína y tretinoína en muestras comerciales conteniendo isotretinoína o tretinoína, ambas en cápsulas blandas. Para el desarrollo de la metodología analítica se evaluó la composición de diversas fases móviles, volúmenes de inyección, flujos de fase móvil y longitudes de onda para la detección ultravioleta de los retinoides analizados. La precisión del sistema fue de 5,07% para la isotretinoína y 3,41% para la tretinoína; los rangos de la precisión del método fueron de 0,167-0,571% para la isotretinoína y de 0,191-0,379% para la tretinoína, valores de exactitud con rangos de 85,21% – 127,35% para la isotretinoína y de 86,19% – 125,40% para la tretinoína. La sensibilidad se determinó estadísticamente en términos de límite de cuantificación, encontrándose valores de 1,3876 ppm para la isotretinoína y de 1,2079 ppm para la tretinoína y límite de detección de 0,4163 ppm para la isotretinoína y de 0,5435 ppm para la tretinoína. La evaluación de la selectividad del método se realizó utilizando el análisis de la pureza de los picos cromatográficos de los retinoides estudiados.

**Palabras clave:** Isotretinoína, Tretinoína, RP-HPLC.

### Abstract

Isotretinoin (13-cis retinoic acid) is a tretinoin synthetic isomer. It is a retinoid derived from vitamin A (retinoic acid). It was developed by Roche Laboratories and it has been available since 1982, being an important advance in acne treatment. This synthetic compound gives a superior therapeutic effect than vitamin A with less side effects and it is been used in dermatological diseases such as recalcitrant quistic acne and others keratinization disorders (follicular keratosis, lamellar ichthyosis and pityriasis *Rubra pilaris*). Oral isotretinoin is registered in national market at concentrations of 5, 10, 15, 20 and 40 mg and is available under different commercial names. The present work describes the development of an analytical method by reversed phase high resolution liquid chromatography with diode array detection able to determine simultaneously retinoid isotretinoin and tretinoin in commercial samples containing isotretinoin or tretinoin, in soft capsules. A series of mobile phases composition, injection volumes, flow rate and ultraviolet wavelength detection were analyzed. Precision of the system was 5.07% for isotretinoin and 3.41% for tretinoin; the precision of method range 0.167-0.571% for isotretinoin and 0.191-0.379% for tretinoin. Accuracy values of 85.21% – 127.35% for isotretinoin and 86.19% – 125.40% for tretinoin were found. Sensitivity was statistically determined in terms of quantification limit being found values of 1.3876 ppm for isotretinoin and 1.2079 ppm for tretinoin and a detection limit of 0.4163 ppm for isotretinoin and 0.5435 ppm for tretinoin. Selectivity analyses were done by peak purity evaluation of studied retinoids.

**Key words:** Isotretinoin, Tretinoin, RP-HPLC.

\* Postgrado de Aseguramiento de la Calidad, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. E-mail: miriamregnault@hotmail.com

## Introducción

La Isotretinoína (ácido-13-cis-retinoico) es el isómero sintético de la Tretinoína, retinoide derivado de la vitamina A, fue desarrollada por Laboratorios Roche y se comenzó a comercializar en el año 1982 lo que constituyó un gran avance en el tratamiento del acné. El compuesto sintético provee un beneficio terapéutico superior a la vitamina A produciendo menos efectos secundarios, es utilizado en el tratamiento de enfermedades dermatológicas serias, tales como el acné quístico recalcitrante y otros desórdenes de la queratinización (queratosis folicular, ictiosis lamelar y pitiriasis *Ru-bra pilaris*). Antes del descubrimiento y desarrollo de la isotretinoína, el acné severo era tratado con antibióticos como las tetraciclinas y la eritromicina, estas drogas actúan sólo sobre uno de los factores que generan el acné, la bacteria *Propionibacterium acnes*. Los antibióticos se han vuelto menos efectivos con el tiempo debido a la proliferación de variedades más resistentes. (Vademécum IQB: <http://www.iqb.es>), (MedlinePlus: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus>).

La principal característica de la isotretinoína es la brusca degradación que puede sufrir en presencia de oxígeno y/o luz, dificultando así su formulación y empaque. En el transcurso de los años, se han descrito varias metodologías analíticas para la determinación de la Isotretinoína contenida en diferentes matrices, entre ellas plasma y tejido cerebral. Yang y colaboradores (2005) emplearon como método de cuantificación la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), utilizando una columna C<sub>18</sub> y una fase móvil compuesta por acetonitrilo: ácido acético en agua al 5% (85:15 v/v); Wu y col. (2004) utilizaron para la determinación de la isotretinoína en muestras sanguíneas de ratones, RP-HPLC con detección de arreglo de diodos y gradiente, una columna Zorbax Rx-C<sub>18</sub>, y una fase móvil compuesta por acetato de amonio (0,1 M), Solución de ácido acético al 2% y metanol, empleando un flujo de 1 mL / min. Gatti, Gioia y Cavrini (2000), describieron en su trabajo la estabilidad de los retinoides farmacéuticos haciendo uso de HPLC con detección de fluorescencia.

La mayoría de las investigaciones se han efectuado sobre formas farmacéuticas de uso tópico en las cuales podemos encontrar la isotretinoína sola o combinada con otros principios activos. Tashtoush y col. (2007), propusieron un método rápido por HPLC para la determinación simultánea de tretinoína e isotretinoína en productos dermatológicos, utilizando la elución isocrática de una fase móvil compuesta de ácido trifluoroacético al 0,01% (TFA): acetonitrilo (15:85 v/v), además evaluaron la fotoestabilidad de las cremas a base de tretinoína y demostraron que el mayor producto de la fo-

toisomerización presente es el 9-cis-ácido retinoico. Kril y col. (1990) estudiaron la determinación de tretinoína en cremas, desarrollando un método por RP-HPLC, para lo cual utilizaron una columna Nova-Pack C<sub>18</sub> de 15 cm, una fase móvil compuesta de tetrahidrofurano y buffer fosfato (42:58 v/v) y un flujo de 1 mL / min. Ye y colaboradores (2004), utilizaron la cromatografía líquida en fase reversa con gradiente y una columna Lichrospher C<sub>18</sub> de 5 mm y 25 cm x 4.6 mm ID, para la determinación de tretinoína y fosfato de clindamicina en formulaciones de uso tópico. Miyagi y col. (2001), al igual que la Farmacopea Americana (USP 31) proponen un método por HPLC en fase normal para determinación simultánea de varios retinoides. Pucci y colaboradores (2001) emplearon un método isocrático por RP-HPLC con una detección UV a 330 nm, una columna C<sub>18</sub>, una fase móvil compuesta por acetonitrilo, diclorometano, metanol y agua, para la determinación simultánea de ácidos trans-retinoicos, betacarotenos y vitamina A en preparaciones galénicas orales.

La Farmacopea Americana (USP 31) aún recomienda como método de cuantificación para la isotretinoína un sistema cromatográfico en fase normal: detector a 365 nm, columna L3 de 4,6 mm x 25 cm (partículas de sílice porosa, de 5 a 10 µm de diámetro), velocidad de flujo de 1 mL / min, una fase móvil compuesta por una mezcla de hexano, acetato de etilo y ácido acético glacial (970:30:0,1). Los tiempos de retención relativos obtenidos con estas condiciones son de aproximadamente 0,75 y 1,00 para la isotretinoína y la tretinoína respectivamente. La resolución (R) entre los picos no debe ser menor de 3,0; el factor de asimetría para el pico de isotretinoína no mayor a 2,5 y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no mayor de 2,0%.

## Materiales y métodos

### REACTIVOS

Reactivo Grado Analítico: ácido acético glacial 100% (Merck, Alemania); buffer acetato de amonio, mínimo 98%. Reactivos Grado HPLC: metanol (Merck, Alemania), acetonitrilo (Merck, Alemania) y agua obtenida a través de un equipo Nanopure marca Barnstead alimentado con agua desionizada proveniente de un equipo marca Pall Corporation. Helio de alta pureza suministrado por la empresa Pariata, C.A. ubicada en la ciudad de Caracas, Venezuela.

### SUSTANCIAS QUÍMICAS DE REFERENCIA

Se emplearon dos estándares de referencia: isotretinoína Sigma no menos de 98% y tretinoína Sigma no menos de 98%, provenientes de la empresa Aldrich,

(USA). Patrón secundario de isotretinoína con una concentración de 99,81% suministrado por el Instituto Nacional de Higiene «Rafael Rangel» y estándares USP de isotretinoína y tretinoína.

#### MUESTRAS

Las muestras analizadas corresponden a productos comerciales de isotretinoína en cápsulas blandas fabricadas por diferentes laboratorios y obtenidas en el mercado nacional.

#### EQUIPO INSTRUMENTAL

El análisis se realizó en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución marca Waters®, conformado por una bomba cuaternaria modelo 600E, un inyector manual Rheodyne con *loop* de 20 µL, un inyector automático modelo 717 plus con carrusel circular de 96 cavidades, un detector de arreglo de diodos (PDA) modelo 996 y una computadora con el programa Millennium 32 (Cienvar, Venezuela), se empleó una columna de fase reversa Spherisorb®, C<sub>18</sub>, 5 µ, 4.6 x 150 mm, ODS2, número de parte PSS831913, lote N° 0147343281.

#### DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

Se ensayaron diferentes fases móviles, preparadas mezclando la fase orgánica con la fase acuosa, filtrando cada una a través de una membrana de nylon de 0,45 µm y desgasificando con vacío y agitación por 10 minutos, cuya composición se describe a continuación: Fase móvil I proporción 80:20 de metanol: buffer acetato de amonio, se llevó a pH 6 con ácido acético glacial. Fase móvil II proporción 90:10 de metanol: buffer acetato de amonio, se llevó a pH 6 con ácido acético glacial. Fase móvil III proporción 85:15 de metanol: buffer acetato de amonio, se llevó a pH 6 con ácido acético glacial. Fase móvil IV proporción 90:9,5:0,5 de metanol: agua: ácido acético glacial. Fase móvil V proporción 85:14,5:0,5 de acetonitrilo: agua: ácido acético glacial. Fase móvil VI proporción 85:14,5:0,5 de acetonitrilo: agua: ácido acético glacial (Tabla I).

#### PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES

Se preparó una solución madre pesando alrededor de 20 mg del estándar de isotretinoína y 20 mg del estándar de tretinoína, tomando en cuenta la pureza de los mismos, se trasvasaron a un balón aforado no actínico de 10 mL, se disolvieron con metanol, se agitaron 2 min en vortex, seguido de 5 min de ultrasonido y por último se llevó a enrase con metanol. Se tomaron volúmenes entre 200 µL y 800 µL, se diluyeron con metanol en balones aforados no actínicos de 10 mL para preparar la siguiente curva de calibración: 40%, 60%, 80%,

100%, 120% 140% y 160%. Para la identificación de los compuestos se emplearon diluciones separadas de estándares secundarios en metanol.

#### PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se realizaron cortes longitudinales a la cápsulas de 20 mg de isotretinoína y de tretinoína, cada cápsula se introdujo en un balón aforado no actínico de 100 mL, se disolvió el contenido de las mismas con metanol, se agitó durante 5 min en vortex seguido de 10 min en ultrasonido y por último se llevó a enrase con metanol, la cápsulas blandas permanecieron enteras no se disolvieron dentro de los balones, el volumen de inyección utilizado fue de 5 µL.

#### DATOS ESPECTROSCÓPICOS

Los espectros de absorción ultravioleta y visible se obtuvieron realizando barridos de longitudes de onda desde los 220 nm hasta los 400 nm con el detector de diodos. (Figura 1). Las longitudes de onda estudiadas fueron tomadas en referencia al trabajo de Shin y colaboradores, 2005.

#### VALIDACIÓN DEL MÉTODO SEGÚN LA USP 32

Se realizó siguiendo los lineamientos para la cuantificación de los principios activos en productos farmacéuticos terminados, descrito en la sección <1225> de la USP 32 NF 27, siendo estos los siguientes parámetros evaluados: precisión, adecuación del sistema, linealidad y rango, límite de detección y cuantificación, selectividad y exactitud.

#### PRECISIÓN DEL SISTEMA

Se determinó inyectando seis (06) replicas de la mezcla de estándares compuesta por isotretinoína y tretinoína a la concentración del 100%. La precisión se determinó calculando la desviación estándar de los tiempos de retención y las áreas obtenidas para cada patrón.

#### PRECISIÓN DEL MÉTODO

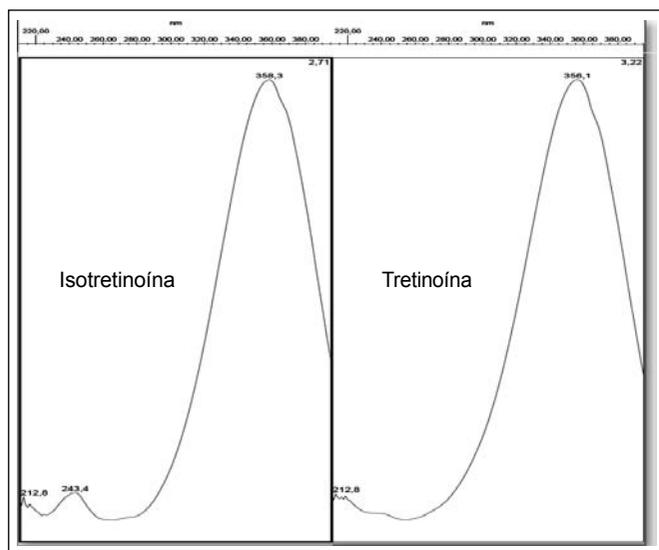
Se realizó inyectando por triplicado tres concentraciones de las muestras correspondientes al 80%, 100% y 120% de la curva de calibración. Se calculó a partir de la desviación estándar de los tiempos de retención y las concentraciones de cada muestra.

#### ADECUACIÓN DEL SISTEMA

A partir de los cromatogramas obtenidos en la evaluación de la precisión del sistema y del método analítico, se calcularon las desviaciones estándares de los

Tabla I  
**Condiciones utilizadas en el desarrollo del método analítico  
 (fase móvil, volumen de inyección, flujo y longitud de onda)**

Condiciones Cromatográficas		Fases Móviles							
		I	II	III	IV	V	VI		
Buffer Acetato de Amonio pH 6		20	20	20	10	15	—	—	—
Metanol		80	80	80	90	85	90	—	—
Acetonitrilo		—	—	—	—	—	—	85	85
Ácido Acético Glacial		—	—	—	—	—	0,5	0,5	0,5
Agua		—	—	—	—	—	9,5	14,5	14,5
Flujo (mL / min)		1	1,2	1,5	1	1	1	1	2
Volumen de Inyección (µL)		20	20	20	20	20	20	20	5
Longitud de Onda (λ) (nm)		348	348	348	348	348	348	353	353
Tiempo de Retención	Isotretinoína	13,3	8,6	6,9	6	7	7	5,9	2,7
	Tretinoína	15,7	—	—	7	9	8	—	3,2
Columna		C18 5 µ	C18 5 µ	C18 5 µ	C18 5 µ	C18 5 µ	C18 5 µ	C18 5 µ	C18 5 µ



**Figura 1. Espectros Ultravioleta de la Isotretinoína y de la Tretinoína en el Rango 220 a 400 nm.**

tiempos de retención y las áreas obtenidas para cada compuesto, los valores promedio de la resolución (R), factor de cola (T), factor de capacidad ( $k'$ ) y número de platos teóricos (N) con sus desviaciones estándar respectivas.

#### LINEALIDAD Y RANGO

Se determinó preparando e inyectando la curva de calibración antes descrita por triplicado en tres días diferentes. El rango de concentración para ambos compuestos fue de 0,04 mg / mL a 1,6 mg / mL. La regresión lineal se obtuvo a partir del promedio de las áreas

obtenidas para cada concentración evaluada. Se calculó el coeficiente de correlación y la desviación estándar de la respuesta.

#### LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Para cada compuesto se estimaron estadísticamente, utilizando la regresión lineal y la desviación estándar de la respuesta (Miller y Miller, 2004), mediante las siguientes fórmulas:  $LD = 3 (DE/b)$  y  $LC = 10 (DE/b)$  respectivamente, donde DE ( $Sy/x$ ) es la desviación estándar de la respuesta y b es la pendiente de la curva de calibración.

#### SELECTIVIDAD

Se determinó realizando para cada compuesto la evaluación de la pureza del pico cromatográfico obtenido mediante el detector de arreglo de diodos a una longitud de onda de 353 nm, lo que consiste en establecer si existen diferencias espectrales entre el ápice y los restantes puntos del pico cromatográfico. (Waters Corporation, 2000).

#### EXACTITUD

El contenido de isotretinoína y tretinoína en las cápsulas se determinó utilizando la regresión lineal de la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración. Los datos obtenidos se reportaron en términos de recuperación tomando como valor de referencia el promedio de seis inyecciones correspondientes a la concentración del 100% de la mezcla de estándares, expresados en mg con un límite de confianza del 95%.

## Resultados y discusión

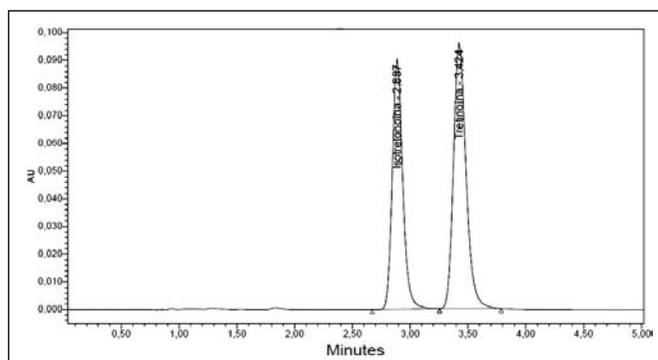
### DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

Se evaluaron diferentes fases móviles compuestas de metanol: buffer acetato de amonio pH 6 en proporciones 80:20(I); 90:10(II) y 85:15(III) utilizando un volumen de inyección de 20 $\mu$ L, longitud de onda de detección de 348 nm y flujos variados de 1,5; 1,2 y 1,0 mL/min. Estas a pesar de mejorar las presiones de trabajo y los tiempos de retención de los retinoides analizados los picos presentaron valores inadecuados de factor de cola (T). Luego, se utilizaron las mezclas de metanol con una solución de ácido acético concentrado al 3,33% en la proporción 90:10 (IV) y 85:15(V) con acetonitrilo, para reducir la polaridad de la misma, con valores de flujo, volumen de inyección y longitud de onda de la forma descrita en la Tabla I. Los mejores resultados fueron obtenidos con la fase móvil de acetonitrilo: ácido acético al 3,33% (85:15) (VI), con un flujo de 2 mL/min; un volumen de inyección de 5 $\mu$ L y una longitud de onda de 353 nm. La Figura 1 muestra los espectros ultravioleta de la isotretinoína y la tretinoína. El resumen de las condiciones cromatográficas, volúmenes de inyección, longitudes de onda y tiempos de retención (Tr) obtenidos se muestran en la Tabla I. Los Tr obtenidos fueron de 2,8 min para el estándar de isotretinoína y de 3,3 min para el estándar de tretinoína. Para corroborar la resolución de ambos picos se procedió a realizar una mezcla de estándares en proporciones adecuadas resultando picos resueltos (Figura 2) y así mismo, se evaluaron las muestras de isotretinoína y tretinoína, utilizando las condiciones indicadas (Figuras 3 y 4).

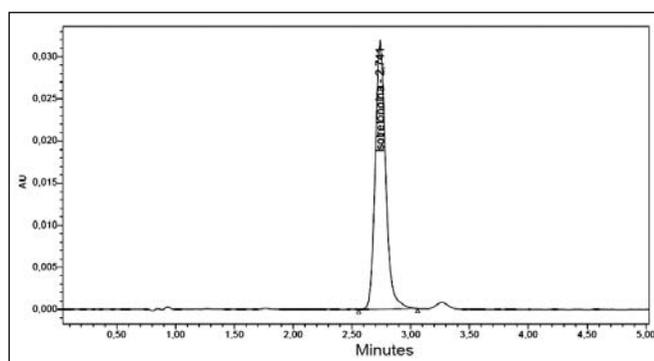
### Validación metodológica

#### PRECISIÓN DEL SISTEMA

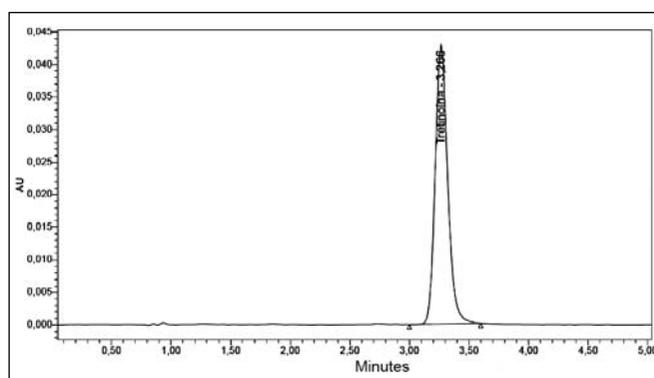
La precisión del sistema fue determinada sobre 6 réplicas del patrón a la concentración de 100% de las



**Figura 2.** Cromatograma de una mezcla de estándares de Iso-tretinoína (0,04 mg/mL) y Tretinoína (0,04 mg/mL) a 353 nm, fase móvil Acetonitrilo: Ácido Acético al 3,33% (85:15), flujo de 2 mL/min. Volumen de inyección: 5  $\mu$ L. Columna Spherisorb Waters<sup>®</sup> C<sub>18</sub>, 5 m, 4,6 x 150 mm, ODS2.



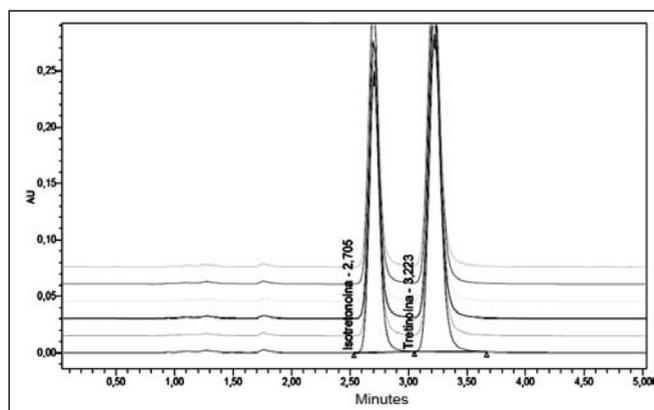
**Figura 3.** Cromatograma de una muestra de Isotretinoína extraída a 353 nm, fase móvil Acetonitrilo: Ácido Acético al 3,33% (85:15), flujo de 2 mL/min. Volumen de inyección: 5  $\mu$ L. Columna Spherisorb Waters<sup>®</sup> C<sub>18</sub>, 5 m, 4,6 x 150 mm, ODS2.



**Figura 4.** Cromatograma de una muestra de Tretinoína extraída a 353 nm, fase móvil Acetonitrilo: Ácido Acético al 3,33% (85:15), flujo de 2 mL/min. Volumen de inyección: 5  $\mu$ L. Columna Spherisorb Waters<sup>®</sup> C<sub>18</sub>, 5 m, 4,6 x 150 mm, ODS2.

cuatro curvas de calibración utilizadas para un total de 24 inyecciones, las cuales presentan una DSR de 5,07% para la isotretinoína y de 3,41% para la tretinoína (Tablas II y III).

En la Figura 5 podemos observar la superposición de seis inyecciones correspondientes a la mezcla de estándares de isotretinoína y tretinoína a una concentración del 100%.



**Figura 5.** Superposición de los cromatogramas de una mezcla de estándares (N=6) de isotretinoína y tretinoína bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas.

Tabla II

**Estudio de la precisión del sistema (N=24) de isotretinoína bajo las condiciones seleccionadas**

Valores Individuales (áreas)				Promedio (áreas)	S	DRS (%)
1671730	1668236	1722304	1507893	1643610	83256,3	5,07
1683015	1664075	1720327	1507107			
1670427	1671462	1715653	1503983			
1671462	1670427	1728157	1508579			
1664075	1683015	1730981	1509280			
1668236	1671730	1725492	1509003			

S: Desviación; DER: Desviación Estándar Relativa.

Tabla III

**Estudio de la precisión del sistema (N=24) de tretinoína bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas**

Valores Individuales (áreas)				Promedio (áreas)	S	DRS (%)
2143251	2143251	2210559	2019983	2127786	72473,14	3,41
2131291	2131291	2204933	2013791			
2141398	2141398	2198892	2011652			
2138801	2138801	2213496	2014384			
2153400	2153400	2219367	2016793			
2144607	2144607	2220669	2016847			

S: Desviación; DER: Desviación Estándar Relativa.

Tabla IV

**Precisión del método de la muestra de isotretinoína expresado como promedio y desviación estándar relativa a tres concentraciones en términos de porcentaje, bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas**

Concentración (%)	Tiempo de Retención (min)	Promedio Tiempo de Retención (min)	DSR (%)	Área	Promedio Área	DSR (%)
80	2,661			1302379		
	2,658	2,660	0,065	1291938	1294137	0,571
	2,661			1288094		
100	2,657			1640793		
	2,655	2,656	0,043	1648449	1649375	0,551
	2,655			1658882		
120	2,655			1985122		
	2,655	2,654	0,044	1980036	1983807	0,167
	2,653			1986262		

DER: Desviación Estándar Relativa.

Tabla V

**Precisión del método de la muestra de tretinoína expresado como promedio y desviación estándar relativa a tres concentraciones en términos de porcentaje, bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas**

Concentración (%)	Tiempo de Retención (min)	Promedio Tiempo de Retención (min)	DSR (%)	Área	Promedio Área	DSR (%)
80	3,170			1308512		
	3,174	3,172	0,066	1308790	1310095	0,191
	3,171			1312983		
100	3,160			1638939		
	3,161	3,160	0,032	1639316	1639269	0,019
	3,159			1639553		
120	3,158			1949210		
	3,159	3,160	0,102	1946251	1951916	0,379
	3,164			1960286		

DER: Desviación Estándar Relativa.

#### PRECISIÓN DEL MÉTODO

Los resultados para evaluar la precisión del método analítico basado en la variación de la concentración en términos de porcentaje del principio activo, según lo recomendado por la USP para la determinación de este parámetro, se muestran en las Tablas IV y V.

#### ADECUACIÓN DEL SISTEMA

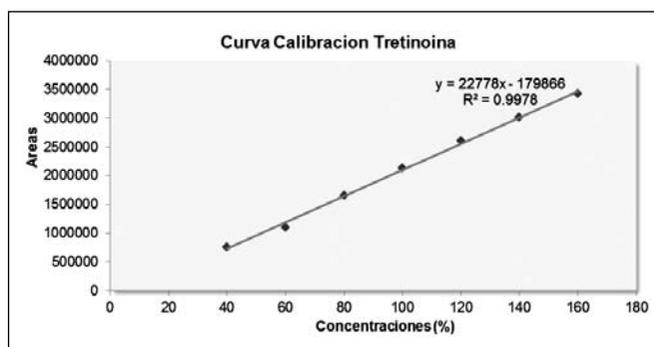
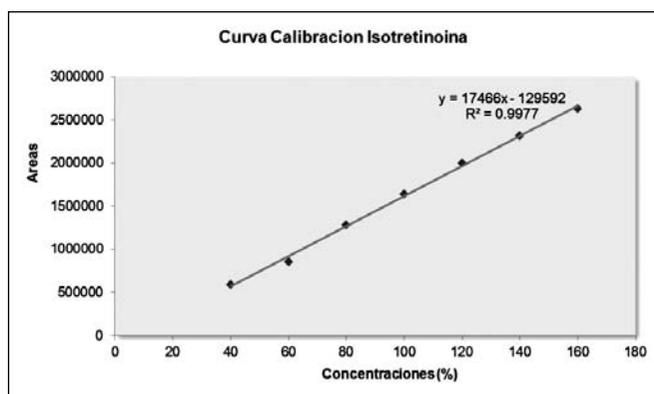
Los resultados para evaluar la adecuación del sistema cromatográfico se expresan en términos de los valores promedio de factor de capacidad ( $k'$ ), factor de cola ( $T$ ), resolución ( $R$ ) y número de platos teóricos ( $N$ ) para la isotretinoína y la tretinoína en la Tabla VI para los estándares y en la Tabla VII para las muestras de los retinoides analizados.

#### LINEALIDAD Y RANGO

Los resultados de linealidad observados en la Figura 6, para un rango de concentración entre 40% y 160% muestran un " $R^2$ " (coeficiente de correlación) para la isotretinoína de 0,9977 y de 0,9978 para la tretinoína.

#### LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Los límites de detección y cuantificación para la isotretinoína y para la tretinoína se calcularon estadísticamente a partir de los datos de regresión lineal y la desviación estándar de la respuesta (Miller y Miller, 2004) obteniéndose valores de 0,4163 y 0,5435 ppm como límites de detección para la isotretinoína y tretinoína respectivamente. Así mismo, obtuvimos valores de límites de cuantificación de 1,3876 y 1,2079 ppm



**Figura 6. Curvas de calibración obtenidas para los estándares de isotretinoína y tretinoína en un rango de concentración de 40% a 160%, bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas.**

para la isotretinoína y tretinoína respectivamente. Estos valores fueron obtenidos a una longitud de onda de 353 nm, fase móvil acetonitrilo: ácido acético al 3,33% (85:15), flujo de 2 mL / min. Volumen de inyección: 5  $\mu$ L. Columna Spherisorb Waters<sup>®</sup> C<sub>18</sub>, 5 mm, 4,6 x 150 mm, ODS2.

Tabla VI

**Resultados de los valores de factor de capacidad (k'), factor de cola (T), resolución (R) y número de platos teóricos (N), promedios y desviación estándar relativa (N=3) de los estándares de isotretinoína y tretinoína a la concentración del 100%, bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas**

	k'	Promedio	DSR (%)	T	Promedio	DSR (%)	N	Promedio	DSR (%)	R	Promedio	DSR (%)
Isotretinoína	1,717			1,24			2805,76			2,404	2,399	0,195
	1,718	1,718	0,074	1,241	1,241	0,041	2838,42	2857,217	2,205	2,394		
	1,719			1,241			2927,48			2,4		
Tretinoína	2,255			1,231			2890,78		—	—	2,399	0,195
	2,259	2,258	0,098	1,234	1,232	0,152	2899,36	2893,203	0,186	—		
	2,26			1,232			2889,47			—		

K': factor de capacidad, DER: desviación estándar relativa, T: factor de cola y N: número de platos teóricos.  
R: resolución.

Tabla VII

**Resultados de los valores de factor de capacidad (k'), factor de cola (T) y número de platos teóricos (N), promedios y desviaciones estándar relativa (N=3) de las muestras de isotretinoína y tretinoína a la concentración del 100%, bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas**

	k'	Promedio	DSR (%)	T	Promedio	DSR (%)	N	Promedio	DSR (%)
Isotretinoína	1,53			1,657			1083,7		
	1,565	1,554	1,308	1,655	1,656	0,084	1048,36	1059,165	2,011
	1,566			1,655			1045,43		
Tretinoína	2,16			1,618			1102,76		
	2,161	2,16	0,045	1,618	1,62	0,173	1083,31	1109,935	2,779
	2,159			1,623			1143,74		

K': factor de capacidad, DER: desviación estándar relativa, T: factor de cola y N: número de platos teóricos.

#### SELECTIVIDAD

La selectividad del método se evaluó empleando el estudio de pureza de los picos cromatográficos obtenidos. El detector de PDA evaluó la pureza de cada pico cromatográfico en cuatro fases, una primera fase consiste en comparar el espectro de cada punto del pico cromatográfico con el espectro obtenido en el ápice, si encuentra diferencias espectrales realiza una nueva evaluación tomando en cuenta el espectro del ápice y el espectro de impureza como referencia, lo que sería la fase dos y continua repitiendo este procedimiento hasta llegar a la fase 4.

Los ángulos de pureza encontrados para los picos cromatográficos de los estándares de isotretinoína y tretinoína fueron 0,085 y 0,069 con un ángulo de umbral 0,236. Para las muestras se encontraron valores de ángulos de pureza de 0,215 y 0,180 y ángulos de

umbral 0,393 y 0,364 para la isotretinoína y la tretinoína respectivamente. Las Figuras 7 y 8 muestran los gráficos de pureza de los picos cromatográficos de los estándares y las muestras de isotretinoína y tretinoína estudiadas. Los valores reportados para el ángulo de pureza (PA) en todos los casos son menores a los valores del ángulo del umbral (TH), lo que garantiza que las diferencias espectrales entre el espectro del ápice y los espectros de cada punto evaluado son mínimas, por lo cual los picos cromatográficos obtenidos corresponden a la isotretinoína y a la tretinoína respectivamente.

#### EXACTITUD

Los valores de exactitud, expresados en términos de porcentajes de recuperación, encontrados para las muestras estudiadas de isotretinoína y tretinoína se presentan en las Tablas VIII y IX.

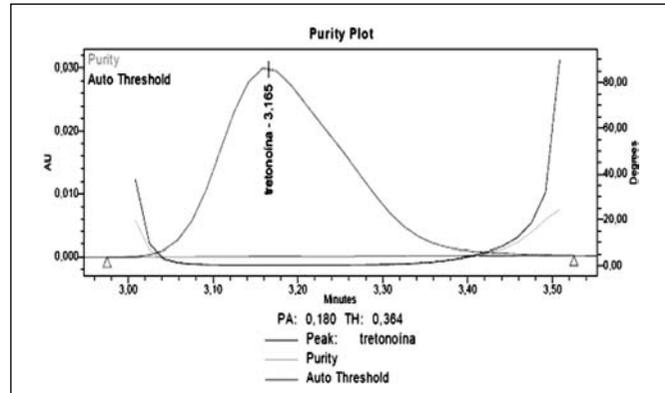
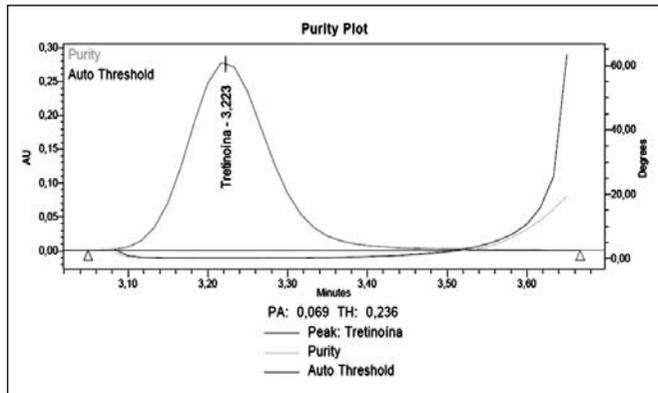
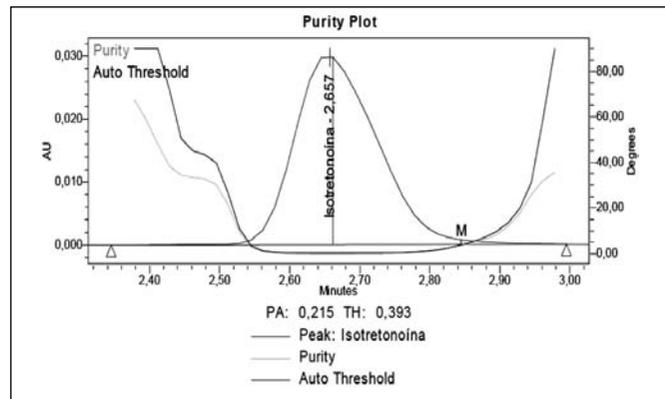
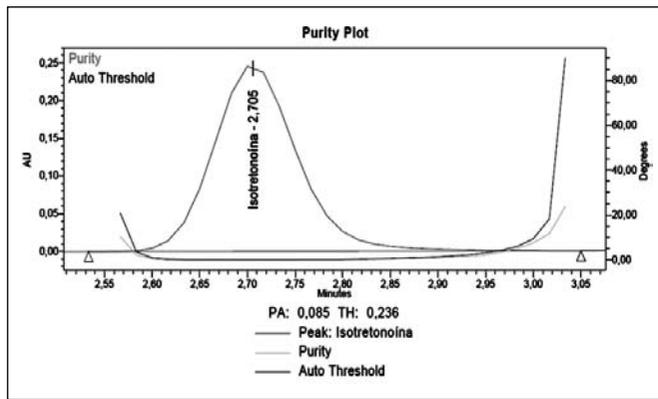


Figura 7. Gráficos de la pureza de los picos cromatográficos de los estándares de isotretinoína y tretinoína.

Figura 8. Gráficos de la pureza de picos cromatográficos de las muestras de isotretinoína y tretinoína.

Tabla VIII

Valores de exactitud del método expresado como porcentajes de recuperación y desviación estándar relativa de la muestra de isotretinoína a tres concentraciones, bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas

Concentración (%)	Tiempo de Retención (min)	Promedio Tiempo de Retención (min)	DSR (%)	Área	Promedio Área	DSR (%)	Recuperación (%)
80	2,661			1302379			85,216
	2,658	2,66	0,065	1291938	1294137	0,571	
	2,661			1288094			
100	2,657			1640793			106,919
	2,655	2,656	0,043	1648449	1649375	0,551	
	2,655			1658882			
120	2,655			1985122			127,352
	2,655	2,654	0,044	1980036	1983807	0,167	
	2,653			1986262			

DER: Desviación Estándar Relativa.

Tabla IX

**Valores de exactitud del método expresado como porcentajes de recuperación y desviación estándar relativa de la muestra de tretinoína a tres concentraciones, bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas**

Concentración (%)	Tiempo de Retención (min)	Promedio Tiempo de Retención (min)	DSR (%)	Área	Promedio Área	DSR (%)	Recuperación (%)
80%	3,170			1308512			
	3,174	3,172	0,066	1308790	1310095	0,191	86,19
	3,171			1312983			
100%	3,16			1638939			
	3,161	3,16	0,032	1639316	1639269	0,019	106,3
	3,159			1639553			
120%	3,158			1949210			
	3,159	3,16	0,102	1946251	1951916	0,379	125,4
	3,164			1960286			

DER: Desviación Estándar Relativa.

## Conclusiones y recomendaciones

El presente trabajo describe el desarrollo de un método analítico por cromatografía líquida de alta Resolución en fase reversa (RP-HPLC) con detección de arreglo de diodos, capaz determinar simultáneamente los retinoides isotretinoína y tretinoína en muestras de cápsulas blandas de especialidades farmacéuticas comerciales con ventajas sobre el propuesto por la USP ya el mismo utiliza una fase normal para su desarrollo.

En la metodología analítica se evaluó la composición de diversas fases móviles, volúmenes de inyección, flujos de fase móvil y longitudes de onda para la detección ultravioleta de los retinoides analizados, encontrándose que los mejores resultados se obtuvieron con una fase móvil conteniendo acetonitrilo y una solución acuosa al 33% de ácido acético (85:14,5:0,5), volumen de inyección: 5 µL, flujo de 2 mL/min y una longitud de onda de 353 nm, empleando una columna Spherisorb Waters<sup>®</sup> C<sub>18</sub>, 5 m, 4,6 x 150 mm, ODS2.

La validación de la metodología reporta los valores de exactitud con rangos de 85,21% – 127,35% para la isotretinoína y de 86,19% – 125,40% para la tretinoína; la precisión del sistema muestra una DER de 5,07% para la isotretinoína y de 3,41% para la tretinoína, en la precisión del método se obtuvo una DER entre 0,167% - 0,571% para la isotretinoína y de 0,191% - 0,379% para la tretinoína; la sensibilidad se determinó estadísticamente en términos de límites de cuantificación de 1,3876 ppm para la isotretinoína y de 1,2079 ppm para la tretinoína y límites de detección

de 0,4163 ppm para la isotretinoína y de 0,5435 ppm para la tretinoína.

Se recomienda emplear el método desarrollado como método alternativo en el control de calidad de muestras provenientes de ensayos de disolución conteniendo isotretinoína, tretinoína o una mezcla de ellas. Esta recomendación se sugiere basados en datos no publicados, obtenidos en el Laboratorio de Análisis de Medicamentos de la Facultad de Farmacia de la UCV, que muestran variabilidad en la disolución y contenido de las cápsulas en forma individual.

## Referencias bibliográficas

- Gatti R, Gioia M, Cavrini V. 2000. Analysis and stability study of retinoids in pharmaceuticals by LC with fluorescence detection. *J Pharm Biomed Anal* 23:147-59.
- Krill MB, Burke KA, DiNunzio JE, Gadde RR. 1990. Determination of tretinoin in creams by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 522:227-34.
- Medline Plus, Servicio de la Biblioteca Nacional de Medicina de EE.UU (sitio en internet). Disponible en: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus>.
- Miller JC, Miller NJ. 2004. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4 ed. Pearson, Practice Hall.
- Miyagi M, Yokohama H, Shiraishi H, Matsumoto M, Ishii H. 2001. Simultaneous quantification of retinol, retinal, and retinoic acid isomers by high-performance liquid chromatography with a simple gradient. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 757:365-368.

- Pucci V, Bugamelli F, Mandrioli R, Raggi MA. 2001. Simultaneous determination of all-trans-retinoic acid, beta-carotene, and vitamin A in galenic preparations by liquid chromatography. *J AOAC Int* 84:354-360.
- Shin S, Kim H, Oh I, Cho Ch, Yang K. 2005. Development of tretinoin gels for enhanced transdermal delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 60: 67-71.
- Tashtoush Bassam M, Jacobson EL, Jacobson Myron K. 2007. A rapid HPLC method for simultaneous determination of tretinoin and isotretinoin in dermatological formulations. *J Pharm Biomed Anal* 43:859-864.
- The United States Pharmacopeia (USP) 31. The United States Pharmacopeia Convention 2009. National Publishing, Philadelphia: USA.
- The United States Pharmacopeia (USP) 32. The United States Pharmacopeia Convention 2010. National Publishing, Philadelphia: USA.
- Vademecum IQB (sitio en internet). Disponible en: <http://www.iqb.es>
- Waters Corporation. «Peak Purity Analysis» Waters 996. Photodiode Detector. Performance Perspectives. 508 478-2000.
- Wu C, Njar V, Brodie A, Borenstein M, Nnane I. 2004. Quantification of a novel retinoic acid metabolism inhibitor, 4-(1H-imidazol-1-yl) retinoic acid (VN/14-1RA) and other retinoids in rat plasma by liquid chromatography with diode-array detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 810:203-208.
- Yang Y, Faustino PJ, Pine PS, Davis H, Grunberg N, Phillips J, Lyon RC, Yu LX, Ciavarella AB, Del Grosso AV, Hanig JP. 2005. Determination of plasma and brain level of isotretinoin in mice following single oral dose by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 37:157-163.
- Ye YR, Bektic E, Buchta R, Houlden R, Hunt B. 2004. Simultaneous determination of tretinoin and clindamycin phosphate and their degradation products in topical formulations by reverse phase HPLC. *J Sep Sci* 27:71-77.