

# Adecuación y validación de un método analítico para la determinación de oxitocina en inyectables por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) con detección de diodos

## Adequacy and Validation of Analytical Method for Determination of Oxytocin Injection by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) with Diode Array Detection

Mirian Regnault\*, María Isabel Novoa, Marlene López, María Eugenia Avilán

### Resumen

Se describe la adecuación y validación de un método analítico para la determinación de oxitocina en inyectables, utilizando cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa con detección ultravioleta de diodos. La literatura oficial reporta un método RP-HPLC en modo gradiente. Se realizaron modificaciones con la finalidad de obtener una metodología por cromatografía en fase reversa en modo isocrático utilizando una columna C18 Spherisorb® 5µ ODS 4,6 mm x 150 mm, fase móvil constituida por una solución A de fosfato monosódico 0,1 M pH 4,5 y una solución B acetonitrilo:agua (1:1) en una proporción A:B (60:40), longitud de onda de detección de 220 nm y velocidad de flujo de 2,5 mL/min. La validación se realizó siguiendo los parámetros establecidos por la Farmacopea Americana y el Comité Internacional de Armonización (ICH). Los parámetros evaluados fueron precisión del sistema y del método, adecuación del sistema, linealidad y rango, selectividad, límite de detección y exactitud. Para la calibración se obtuvo un valor de  $y = 5,44 \times 10^5 X + 4,23 \times 10^5$  y  $r = 0,9997$  en un rango comprendido entre 0,69UI y 3,22 UI de oxitocina. Se reporta la adecuación de sistema en términos de tiempo de retención (TR), área (A), factor de cola (T), factor de capacidad (k'), ancho del pico al 5% de la altura y número de platos teóricos (N) así como las desviaciones estándar relativas (DSR) correspondientes: TR =  $2,617 \pm 1,707$ ; A =  $1.158.213 \pm 2,97$ ; T =  $1,063 \pm 0,759$ ; K =  $1,617 \pm 2,758$  y N =  $5116 \pm 12,7$ . En el estudio de selectividad, se realizó la comparación de los espectros ultravioleta de la oxitocina de las muestras de los laboratorios A, B y C contra el espectro UV de oxitocina estándar USP. Adicionalmente se evaluó la pureza del pico cromatográfico en términos de la posible co-elución, interferencia del ruido del sistema o solvente a la longitud de onda de estudio. Se encontró variación entre los ángulos de contraste espectral de las muestras de los diferentes laboratorios, cuyos valores fueron 0,567; 2,456 y 6,994 respectivamente. Estos resultados justifican que la metodología reportada pudiera utilizarse para evaluar la calidad de origen de la materia prima utilizada por la industria farmacéutica, en la fabricación de estos productos y recomendamos esta aplicación.

**Palabras clave:** oxitocina, RP-HPLC, detección de diodos, pureza cromatográfica.

### Abstract

We describe the adequacy and validation of an analytical method for determining oxytocin injections using reverse phase high resolution liquid chromatography with photodiode array detection. The official literature reports a RP-HPLC method with a gradient elution mode. Modifications were made in order to obtain an isocratic reverse phase chromatography method using a Spherisorb® C18 column ODS 5µ 4.6 mm x 150 mm, mobile phase mixture with monobasic sodium phosphate 0.1M pH 4.5 (solution A) and acetonitrile:water (1:1, Solution B), in a 60:40 proportion respectively. Detection wavelength of 220 nm and flow rate of 2.5 mL/min. The validation was performed following guidelines established by the U.S. Pharmacopeia and the International Committee of Harmonization (ICH). The parameters evaluated were: system and method precision, system suitability, linearity and range, selectivity, detection limit and accuracy. For calibration, we obtained a value of  $y = 5.44 \times 10^5 X + 4.23 \times 10^5$  and  $r = 0.9997$  in a range between 0.69 and 3.22 IU of oxytocin. We report system suitability in terms of retention time (RT), area (A), tailing factor (T), capacity factor (k'), peak width at 5% height and number of theoretical plates (N) and relative standard

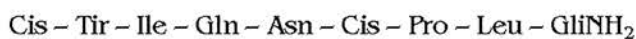
\* Postgrado de Aseguramiento de la Calidad, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.  
E-mail: miriamregnault@hotmail.com

deviations (DSR): RT = 2.617 ± 1.707, A = 1,138,213 ± 2.97, T = 1.063 ± 0.759, K' = 1.617 ± 2.758 and N = 5116 ± 12.7 In selectivity studies we compared oxytocin ultraviolet spectra from samples of laboratories A, B and C against USP oxytocin spectra. Additionally, we assessed the purity of chromatographic peak in terms of possible coelution, interference of system noise or solvent at the wavelength studied. Variations were found between the spectral contrast angles on samples from different laboratories, the values were 0.567, 2.456 and 6.994 respectively. These results indicated that our methodology could be used to evaluate the quality of raw material used to make these products by pharmaceutical industries and we recommend this application.

**Key words:** oxytocin, RP-HPLC, photodiode array detection, chromatographic purity.

## Introducción

La oxitocina es un polipéptido cuya fórmula molecular es  $C_{43}H_{66}N_{12}O_{12}S_2$ . La secuencia para los 9 aminoácidos que la conforman es la siguiente:



Es un polvo blanco, peso molecular 1007 g/mol, muy soluble en agua y en soluciones diluidas de ácido acético y de etanol (Merck Index, 1983). Los preparados comerciales de oxitocina son sintéticos y la potencia se expresa en unidades USP, siendo cada unidad el equivalente a 2 µg de la hormona pura (Goodman y col., 1991). La concentración de las presentaciones comerciales puede venir expresada tanto en unidades USP como en unidades internacionales (UI), siendo éstas equivalentes (USP 36, 2013). El inyectable de oxitocina contiene 10 unidades USP por mililitro y se puede administrar por vía intravenosa o intramuscular, también se presenta en forma de aerosol nasal con una concentración de 40 unidades USP por mililitro.

La oxitocina es el fármaco de elección para la inducción del trabajo de parto, debe administrarse por infusión intravenosa de una solución diluida, de preferencia mediante una bomba de infusión de velocidad variable, para todas las indicaciones previas al parto excepto el aborto (Parker y Schimmer, 2006). La concentración apropiada para utilizar en la inducción del trabajo de parto de término es de 10 miliunidades por mililitro. Aunque hay un continuo debate en relación con el procedimiento óptimo para la administración de la oxitocina, muchos médicos aconsejan el protocolo desarrollado por Seitchik y Castillo (1982, 1983). Este implica una dosis inicial de 1 miliunidad por minuto, luego un aumento de la dosis con una frecuencia no mayor de 1 miliunidad por minuto cada 30 minutos y el mantenimiento de una dosis de 4 miliunidades por minuto (si es la alcanzada) durante no menos de 1 hora antes de seguir aumentando la dosis (Goodman y col., 1991). La oxitocina puede iniciar o aumentar las contracciones rítmicas en cualquier momento, pero al princi-

pio del embarazo sólo dosis muy grandes provocan una respuesta. La oxitocina naturalmente secretada aumenta la concentración en el cuerpo humano alrededor de ocho veces entre las semanas veinte y treinta y ocho de gestación. La mayor parte de este incremento se produce durante las últimas nueve semanas. Por ello, la infusión intravenosa lenta de unas pocas unidades de oxitocina suele ser efectiva para iniciar el trabajo de parto de término. No obstante, existen variaciones individuales considerables en esta respuesta, habiéndose iniciado el trabajo de parto con la infusión de apenas 25 miliunidades (0,05 µg) de oxitocina (Goodman y col., 1991).

Calam (1978) señaló que la Oxitocina es un producto biológico, cuya potencia o actividad puede ser determinada por una valoración biológica. La mayoría de los ensayos biológicos son capaces de obtener una alta sensibilidad y selectividad de la potencia de los productos biológicos. Los resultados obtenidos por bioensayos están sujetos a errores debido a la inherente variabilidad de las respuestas biológicas y los resultados de diferentes laboratorios usualmente no pueden ser comparados. Estos usualmente son complejos, costosos, largos y relativamente de una pobre reproducibilidad, por lo que hoy en día se incentiva su sustitución por métodos químicos o físicos simples, más económicos, rápidos y precisos.

Entre los métodos físico-químicos más utilizados hoy en día tenemos la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que puede ser aplicado para determinar la hormona oxitocina. En los métodos oficiales (Farmacopea Europea 2002, Farmacopea Americana, USP 36, NF 31, 2013, Farmacopea Británica, BP 2002), se utiliza HPLC con gradiente de fase móvil para la determinación del contenido de oxitocina. La longitud de onda oscila entre 210-220 nm y el pico cromatográfico se obtiene alrededor de los 15 min. Frei, Michel y Santi (1976) utilizaron una post-columna de derivación de péptidos, que permite llevar a cabo derivaciones cuantitativas en una hora, a una longitud de onda de 390-470 nm. El fluoram fue el reactivo fluorogénico empleado. Krummen y Frei (1977) utilizaron un método isocrático con dosis

bajas de oxitocina y demostraron que se dificulta la determinación de la misma ya que a la longitud de onda de 210 nm aparecen picos de solventes y proponen el uso de un método alternativo basado en derivación y uso de un detector fluorescente. Ohta y col. (1987) analizaron la oxitocina mediante un método isocrático a una longitud de onda de 210 nm y demostraron que la variación del pH influye en la separación de los picos cromatográficos. Chaibva y Walker (2007) desarrollaron y validaron un método analítico indicador de estabilidad para la cuantificación de oxitocina en productos farmacéuticos. Karbiwnyk y col. (2008) determinaron oxitocina en solución intravenosa por cromatografía líquida con detección de masas. En este trabajo presentamos un método isocrático alternativo para el análisis de oxitocina por HPLC con detección ultravioleta utilizando un cromatógrafo líquido acoplado a un detector de arreglos de diodos (PDA).

## Materiales y métodos

### REACTIVOS

Agua grado HPLC obtenida de un equipo Barnstead alimentado con agua tridestilada. Acetonitrilo grado HPLC. Fosfato monosódico grado reactivo 99,0% (Riedel-de Haën, Didacta, Caracas-Vzla). Clorobutanol Lote 326A. Ácido acético glacial grado analítico 99,7% (Scharlau, Didacta, Caracas-Vzla). Etanol grado reactivo 99,8% (Riedel-de Haën, Didacta, Caracas-Vzla). Acetato de sodio anhidro 99,0% (Riedel-de Haën, Didacta, Caracas-Vzla). Helio (Airgas, Caracas-Vzla).

### SUSTANCIAS QUÍMICAS DE REFERENCIA

Patrón primario USP de oxitocina (The United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Maryland-USA).

### MUESTRAS

Las muestras analizadas corresponden a productos comerciales de inyectables de oxitocina fabricadas por diferentes laboratorios obtenidas en el mercado nacional. Las muestras fueron inyectadas directamente en el cromatógrafo a las concentraciones descritas en el texto sin dilución alguna.

### EQUIPO INSTRUMENTAL

Cromatógrafo líquido conformado por Bomba 600E, Inyector Rheodyne con loop de 200  $\mu$ L, Detector de Arreglo de Diodos (PDA) 996, PC con programa Millennium 32 (Waters, Cienvar, Caracas-Vzla). Columna Spherisorb<sup>®</sup> (C<sub>18</sub>) 5  $\mu$  ODS 4,6 x 150 mm (Waters Cienvar Caracas-Venezuela). Ultrapurificador

de agua Nanopure (Barnstead). Bomba de vacío (Millipore).

### PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES

La ampolla patrón USP de oxitocina declara 46 Unidades USP de Oxitocina por vial. Se reconstituyó con cantidad suficiente de diluyente para 2 mL. Se obtuvo una solución madre de una concentración de 23 Unidades USP/mL.

### PREPARACIÓN DEL DILUYENTE

Se disolvieron 0,5 g de clorobutanol en 0,5 mL de ácido acético glacial. Se adicionaron 630  $\mu$ L de etanol, 0,11 g de acetato sódico, 100 mL de agua grado HPLC y se mezcló. Este diluyente es equivalente a la solución placebo de los inyectables comerciales.

### METODOLOGÍA ANALÍTICA

La selección de la fase móvil se basó en el método oficial de la USP 36-NF 31 que describe el análisis de oxitocina por HPLC, donde la fase móvil contiene buffer fosfato y acetonitrilo (ACN). Se evaluaron fases móviles en diferentes proporciones (A: B) (40:60), (45:55), (50:50) y (60:40), utilizando una solución A de fosfato monosódico 0,1 M pH  $\approx$  4,5 y solución B de ACN: H<sub>2</sub>O (1:1). A medida que se disminuyó la concentración de la fase orgánica en la fase móvil se incrementó la interacción de la oxitocina con la fase estacionaria hasta obtener la mejor separación con la última proporción anteriormente descrita. Para la selección de la velocidad de flujo se evaluó a 1,5 mL/min, el pico cromatográfico de oxitocina se obtuvo a 5,806 minutos con un bajo número de platos teóricos y una presión del sistema cromatográfico de 1440 psi. Se aumentó a 2,0 mL/min con la finalidad de disminuir el tiempo de retención y se obtuvo el pico a los 4,458 minutos con mayor número de platos teóricos y una presión de 1900 psi. Se aumentó luego la velocidad de flujo a 2,5 mL/min obteniéndose el pico a los 2,569 minutos con una presión de 2390 y un mayor número de platos teóricos. Las condiciones finales seleccionadas fueron las siguientes: Columna C<sub>18</sub> Spherisorb<sup>®</sup> 5  $\mu$  ODS 4,6 nm x 150 mm; velocidad de flujo 2,5 mL/min; fase móvil solución A de fosfato monosódico 0,1 M pH 4,5 y solución B ACN: H<sub>2</sub>O (1:1) en una proporción (A: B) (60:40). Esta mezcla fue filtrada usando membrana de 0,45  $\mu$ m y desgasificada con agitación al vacío por 15 min; longitud de onda 220 nm; volumen de inyección 200  $\mu$ L y tiempo de corrida 13 min.

### DATOS ESPECTROSCÓPICOS

Se evaluaron las lecturas del área del pico de oxitocina a diferentes longitudes de onda. La longitud



de onda de máxima absorción obtenida por el equipo de arreglo de diodo para oxitocina fue de 194,1 nm (Figura 2). Se evaluaron las unidades de absorbancia a las longitudes de onda propuestas en la literatura de 210 nm y 220 nm (Krummen, 1976), así como a un valor intermedio de 214 nm. Se consideró que a longitudes de onda ( $\lambda$ ) muy bajas tales como 210 y 214 nm, la determinación de oxitocina se dificulta ya que se observó la presencia de señales inherentes al solvente, por esta razón se seleccionó 220 nm como longitud de onda de detección, con la cual obtuvimos picos cromatográficos de oxitocina cuantificables.

#### VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Se realizó siguiendo los lineamientos para la cuantificación de principios activos en productos farmacéuticos terminados, descrito en la sección <1225> de la USP 36 NF 31. Se evaluaron los siguientes parámetros: precisión, adecuación del sistema, linealidad y rango, límite de detección, selectividad y exactitud.

#### PRECISIÓN DEL SISTEMA

Se determinó inyectando seis (06) réplicas del estándar de oxitocina del nivel intermedio de la curva de calibración. La precisión se determinó calculando la desviación estándar de las concentraciones obtenidas para el estándar.

#### PRECISIÓN DEL MÉTODO

Se determinó inyectando seis (06) réplicas de la muestra de oxitocina del inyectable comercial (Laboratorio A) al nivel intermedio de la curva de calibración. La precisión se determinó calculando la desviación estándar de las concentraciones obtenidas para el estándar.

#### ADECUACIÓN DEL SISTEMA

Se calcularon las desviaciones estándares de los valores promedio de los tiempos de retención, factor de cola (T), factor de capacidad ( $k'$ ) y número de platos teóricos (N) y ancho de pico cromatográfico al 5% de la altura con sus desviaciones estándar respectivas para seis réplicas de 90  $\mu$ L de la curva de calibración de oxitocina estándar utilizando el programa Millenium 32<sup>®</sup> de Waters.

#### LINEALIDAD Y RANGO

Se determinaron inyectando tres réplicas de los cinco niveles de concentración utilizando diferentes volúmenes del estándar USP de oxitocina: 30  $\mu$ L (0,69 UI); 70  $\mu$ L (1,61 UI); 90  $\mu$ L (2,07 UI); 110  $\mu$ L (2,53 UI) y 140  $\mu$ L (3,22 UI). La regresión lineal se

obtuvo a partir del promedio de las áreas obtenidas para cada concentración evaluada en un rango entre el 40 y 160% del contenido declarado del vial. Se calculó la ecuación de la línea recta y el coeficiente de correlación.

#### SELECTIVIDAD

Se determinó la pureza espectral del pico cromatográfico evaluando la existencia de diferencias espectrales entre el ápice y los puntos restantes del pico mediante el detector de arreglo de diodos a una longitud de onda de 220 nm. (Waters Corporation, 2000).

#### LÍMITE DE DETECCIÓN

Se obtuvo experimentalmente inyectando 15  $\mu$ L (0,15 UI); 7,5  $\mu$ L (0,075 UI) y 3,75  $\mu$ L (0,0375 UI) de una muestra de 10 UI/mL de oxitocina. Se evaluó la calidad cromatográfica de la señal producida en términos del valor de la relación señal/ruido obtenida en cada caso.

#### EXACTITUD

La exactitud se determinó calculando el porcentaje de recuperación de tres concentraciones de un producto comercial de oxitocina. Los volúmenes inyectados por triplicado fueron 80  $\mu$ L (1,6 UI); 100  $\mu$ L (2,0 UI) y 120  $\mu$ L (2,4 UI), de acuerdo a la concentración declarada por el producto. Los volúmenes calculados inicialmente para la evaluación del producto eran 160, 200 y 240  $\mu$ L, sin embargo, debido a que el volumen del *loop* disponible era de 200  $\mu$ L, se decidió inyectar la mitad de los volúmenes y aplicar un factor de 2 en los cálculos para obtener los porcentajes recomendados por la farmacopea para este estudio (80%, 100% y 120%).

## Resultados y discusión

#### MÉTODO CROMATOGRÁFICO

La Figura 1 muestra el cromatograma obtenido utilizando el método descrito en la USP 34 para la evaluación de oxitocina. Se utilizó una columna C18 Spherisorb 5  $\mu$  ODS 4,6 mm x 150 mm, velocidad de flujo 1,5 mL/min, fase móvil en modo gradiente con una condición inicial A:B (70:30) y una condición final A:B (50:50), siendo A una solución de fosfato monosódico 0,1 M pH 4,5 y B una mezcla acetonitrilo: agua (1:1), realizando un cambio lineal en la composición de la fase móvil en un lapso de 20 min y a una longitud de onda de 220 nm.

Con la finalidad de realizar la determinación de oxitocina de forma isocrática se procedió a evaluar una serie de proporciones de A y B. Estas combina-

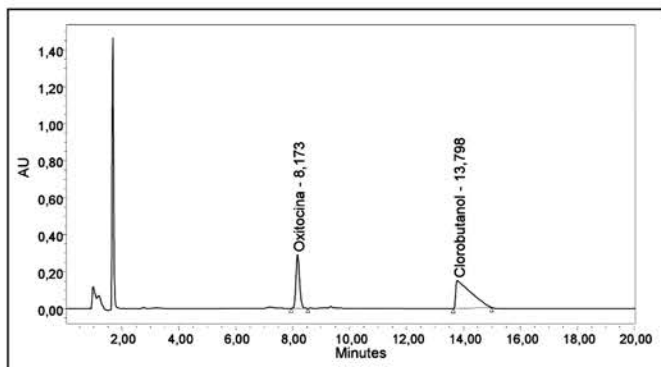


Figura 1. Cromatograma correspondiente a 1UI de oxitocina siguiendo el método descrito en la USP 34.

ciones fueron A:B (45:55), (50:50) y (60:40). La mejor separación se logró con esta última proporción. Por otra parte, se estudiaron los cromatogramas obtenidos utilizando diferentes longitudes de onda 210 nm, 214 nm y 220 nm. La oxitocina presentó su máximo de absorbancia a 194,1 nm (Figura 2); sin embargo, a esta longitud los solventes pueden interferir en la lectura del pico de interés (Regnault, 2004). Se seleccionó la longitud de onda 220 nm ya que los parámetros para la adecuación del sistema tales como número de platos teóricos, simetría del pico y factor de capacidad mostraron valores adecuados para la reproducibilidad del método y la cuantificación de la oxitocina. Así mismo, se estudiaron varias velocidades de flujo de fase móvil: 1,5; 2,0 y 2,5 mL/min; seleccionándose 2,5 mL/min debido a que se logró un tiempo de corrida de 13 min manteniendo la calidad del resto de los parámetros cromatográficos. La Figura 3 muestra el cromatograma de 1UI de oxitocina estándar USP utilizando los parámetros seleccionados descritos.

VALIDACIÓN METODOLÓGICA

Una vez desarrollado el método, se procedió a la validación del mismo tal como se describe en la sección de Materiales y métodos.

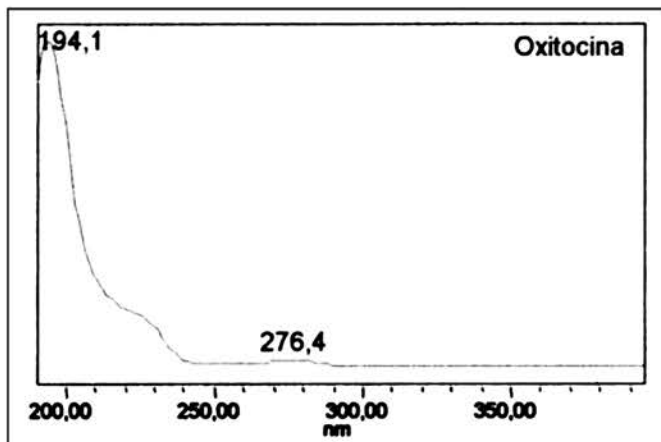


Figura 2. Espectro ultravioleta de una inyección de 45 UI/mL del estándar USP de oxitocina.

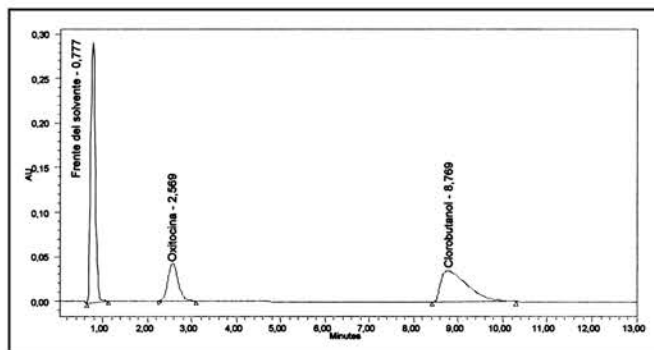


Figura 3. Cromatograma obtenido para 1UI de oxitocina estándar utilizando los parámetros cromatográficos seleccionados descritos en el texto.

PRECISIÓN DEL SISTEMA

La precisión del sistema fue determinada sobre 6 réplicas del patrón a la concentración intermedia de la curva de calibración para lo cual se inyectaron en el cromatógrafo 45µL de la solución del estándar obteniéndose desviaciones estándar relativa de 2,99%. Este valor por encima del 2% lo consideramos aceptable debido a que la inyección fue realizada manualmente en un loop de 200µL, adicionalmente este volumen representa menos del 25% del volumen total del loop lo que pudo disminuir la precisión del sistema debido al error en la dilución del estándar (Tabla I).

Tabla I

Estudio de la precisión del sistema (N=6) de oxitocina estándar bajo las condiciones seleccionadas\*

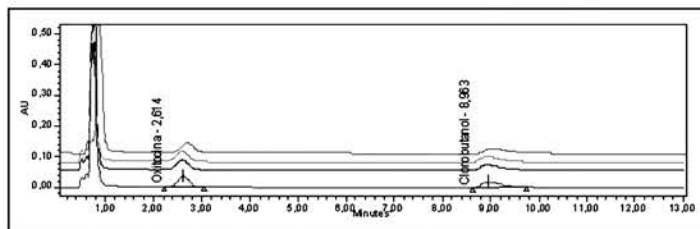
Inyección	Área	Área total	UI/90 µL	UI/mL
1	549930	1099860	2,0155	22,3944
2	556862	1113724	2,0410	22,6777
3	564510	1129020	2,0692	22,9911
4	564002	1128004	2,0673	22,9700
5	593022	1186044	2,1741	24,1566
6	586313	1172626	2,1494	23,8822
Promedio				23,1786
s				0,6922
DSR				2,9865

\* Se inyectaron 45 µL (El área obtenida se multiplica x 2 con la finalidad de obtener el resultado al 100%). S: desviación estándar; DSR: desviación estándar relativa.

En la Figura 4 podemos observar la superposición de seis inyecciones correspondiente oxitocina estándar a una concentración del 100%.

PRECISIÓN DEL MÉTODO

Se determinó inyectando seis (06) replicas de la muestra de oxitocina del inyectable comercial



**Figura 4. Superposición de los cromatogramas de oxitocina estándar bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas.**

(Laboratorio A) al nivel intermedio de la curva de calibración para lo cual se inyectaron 100  $\mu$ L de la muestra obteniéndose desviaciones estándar relativa de 1,32% (Tabla II).

**Tabla II**

**Estudio de la precisión del Método (N=6) de oxitocina muestra del Laboratorio A, bajo las condiciones seleccionadas\***

Inyección	Área	Área total	UI/90 $\mu$ L	UI/mL
1	621589	1243178	2,2792	11,3961
2	643423	1286846	2,3595	11,7978
3	639210	1278420	2,3440	11,7203
4	642566	1285132	2,3564	11,7820
5	643156	1286312	2,3585	11,7929
6	640910	1281820	2,3503	11,7515
			Promedio	11,7067
			s	0,1549
			DSR	1,3236

\* Se inyectaron 100 $\mu$ L (El área obtenida se multiplica x 2 con la finalidad de obtener el resultado al 100%). S: desviación estándar; DSR: desviación estándar relativa.

**Tabla III**

**Resultados de los valores de factor de capacidad ( $k'$ ), factor de cola (T) y número de platos teóricos (N), promedios y desviación estándar (N=6) del estándar de oxitocina al nivel del 100%, de la curva de calibración, bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas**

Nº Iny.	TR	Área	T	$k'$	Ancho 5%	N
1	2,614	1099860	1,0644	1,6135	0,53266	6178,9
2	2,603	1113724	1,0612	1,6034	0,55713	5557,8
3	2,601	1129020	1,0666	1,6012	0,58650	5039,5
4	2,596	1128004	1,0663	1,5959	0,60178	4707,4
5	2,706	1186044	1,0472	1,7060	0,62150	4830,3
6	2,583	1172626	1,0699	1,5833	0,61185	4382,0
Promedio	2,617	1138213	1,0626	1,6170	0,5852	5115,9
s	0,0446	33856,9279	$8,06 \times 10^{-5}$	0,0446	0,034	650,9
DSR	1,7069	2,9745	0,7591	2,7581	5,8478	12,7

$k'$ : factor de capacidad, TR: tiempo de retención, T: factor de cola y N: número de platos teóricos, S: desviación estándar; DER: desviación estándar relativa.

## ADECUACIÓN DEL SISTEMA

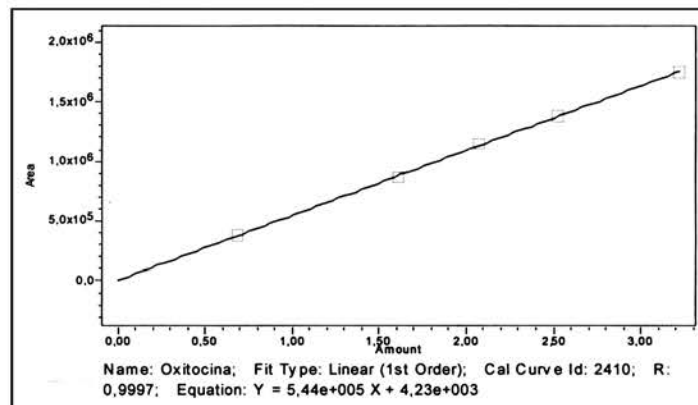
Los resultados para evaluar la adecuación del sistema cromatográfico se expresaron en términos de los valores promedio de Tiempos de retención (TR), factor de capacidad ( $k'$ ), factor de cola (T), número de platos teóricos (N) y ancho del pico cromatográfico al 5% de la altura, para la oxitocina estándar utilizada (Tabla III).

## LINEALIDAD Y RANGO

Los resultados de linealidad observados en la Figura 5 fueron muy buenos para un rango de concentración entre 40% y 160% y muestran un valor de regresión R para la oxitocina de 0,9997 con una pendiente:  $5,44 \times 10^5$  y un intercepto:  $4,23 \times 10^3$ .

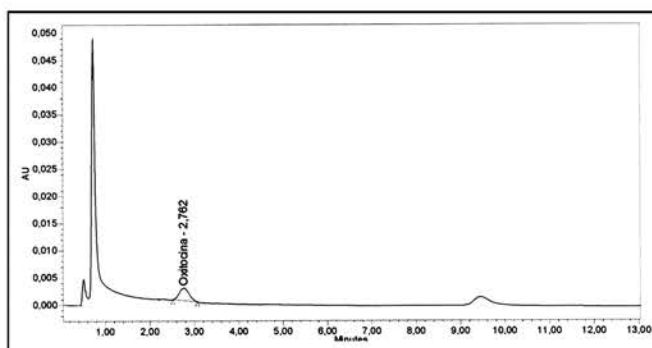
## SELECTIVIDAD

La selectividad del método se evaluó empleando el estudio de pureza de los picos cromatográficos



**Figura 5. Curva de calibración obtenidas para el estándar de oxitocina en un rango de concentración de 40% a 160%, bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas.**

obtenidos. El detector de PDA evaluó la pureza del cada pico cromatográfico en cuatro fases. La primera fase compara el espectro de cada punto del pico cromatográfico con el espectro obtenido en el ápice, si se encuentran diferencias espectrales se realiza una nueva evaluación tomando en cuenta tanto el espectro obtenido en el ápice del pico y aquel obtenido en el punto de impureza espectral, lo que sería la fase dos y continua repitiendo este procedimiento hasta llegar a la fase 4. Los ángulos de pureza (PA) obtenidos para las cuatro fases fueron de 0,728; 0,358; 0,305 y 0,286 respectivamente, con un umbral (*autothreshold*, TH) alrededor de 0,7 (Figura 6). Se encontró una leve diferencia espectral en la primera fase (PA = 0,728 > TH = 0,7) que puede deberse a la interferencia de algún solvente utilizado capaz de leer a la longitud de onda del análisis (220nm). Sin embargo, para las fases 2, 3 y 4 no existieron diferencias espectrales con respecto al espectro del ápice del pico cromatográfico (valores de ángulos de pureza menores al ángulo del umbral). Estos resultados demostraron que el pico cromatográfico analizado corresponde a la oxitocina sin interferencias significativas.



**Figura 7. Cromatograma de la muestra de oxitocina en inyectable correspondiente a 0,0375 UI bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas.**

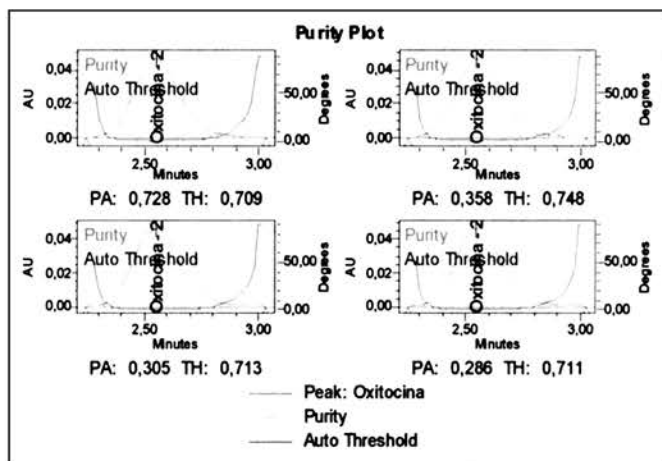
y 120%), para ello se inyectaron tres réplicas de cada nivel (80 µL, 100 µL y 120 µL respectivamente). A continuación se muestran los resultados para las muestras del laboratorio A (Tabla IV).

**Tabla IV**

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

Concentración	Muestras	Área	Área total	UI recup.	UI/mL	% Rec.
80%	1	513048	1026096	1,8798	9,3993	117,49
	2	513372	1026744	1,8810	9,4053	117,56
	3	511660	1023320	1,8747	9,3738	117,17
100%	1	642566	1285132	2,3564	11,7820	117,82
	2	643423	1286846	2,3595	11,7978	117,97
	3	643156	1286312	2,3585	11,7929	117,93
120%	1	764619	1529238	2,8054	14,0273	116,89
	2	767619	1535238	2,8165	14,0825	117,35
	3	763840	1527680	2,8026	14,0131	116,77
Promedio						117,43
s						0,4351
DSR						0,3705

S: desviación estándar; DSR: desviación estándar relativa.



**Figura 6. Gráficos de la pureza de picos cromatográficos de una muestra de oxitocina en inyectable.**

**LÍMITE DE DETECCIÓN**

Para su determinación se inyectaron volúmenes decrecientes de la muestra de oxitocina conteniendo 10UI/mL. La Figura 7 muestra el cromatograma de 0,0375 UI de oxitocina, esta cantidad de oxitocina fue detectada con una integración valle-base y una relación señal/ruido de 2, considerando éste el límite de detección del procedimiento descrito en el presente trabajo (Regnault, 2004).

**EXACTITUD**

Se evaluó determinando el porcentaje de recuperación de 3 niveles de concentración (80%, 100%

La USP 36 establece que el contenido de oxitocina en inyectables no debe ser menor al 90,0% ni mayor al 110,0%. Nuestros resultados muestran porcentajes de recuperación mayores al 110%, (117,43%) con desviaciones menores al 2%. Estos resultados fueron reproducibles, lo que permite inferir que las muestras del Laboratorio A evaluadas presentaron un exceso en el contenido de oxitocina. Nuestros resultados son similares a los reportados por Avilán, 2010, quien utilizando un método por electroforesis capilar y las mismas muestras obtuvo resultados similares en los rangos estudiados. Estos



resultados descartan la posibilidad del efecto matriz de los inyectables analizados ya que el clorobutanol contenido en los mismos eluye de la columna aproximadamente a 9,5 min; es decir con una resolución bastante amplia. Por otra parte, consideramos que a pesar de que los valores de oxitocina encontrados en los inyectables estudiados, están fuera de los límites establecidos no representan riesgo médico ya que el uso clínico de los mismos incluye dilución en soluciones intravenosas de gran volumen utilizando una bomba de infusión a una concentración de 10 mUI/mL (Parker y Schimmer, 2006).

#### EVALUACIÓN DE MUESTRAS

Se evaluaron inyectables de oxitocina de tres laboratorios diferentes utilizando el método descrito en este trabajo. Los resultados se muestran en la Tabla V.

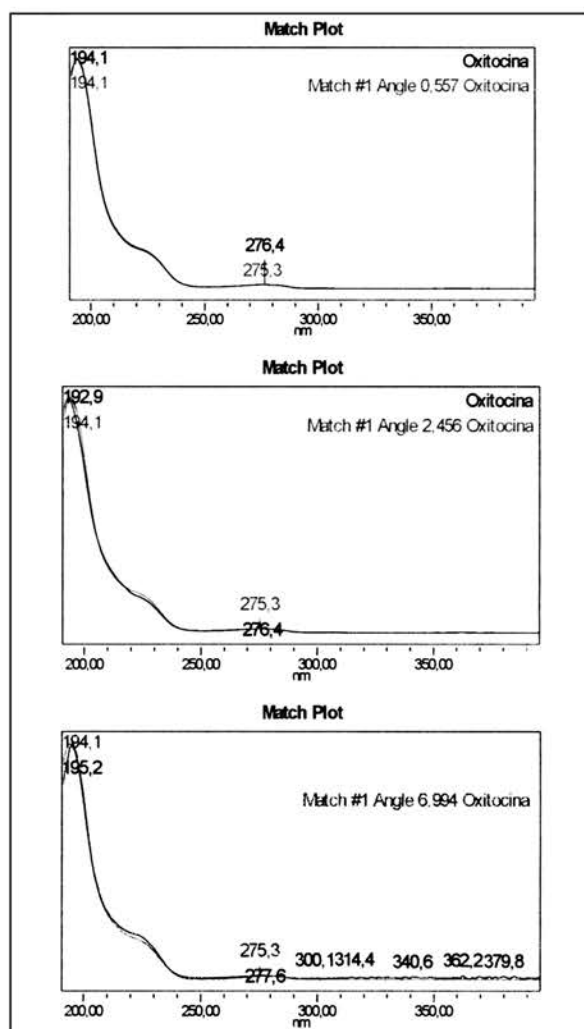
**Tabla V**

**Resultados obtenidos de la evaluación de muestras de tres laboratorios diferentes**

Muestra	Área	Área total	UI obtenido	UI/mL	% rec.
Laboratorio A	650573	1301146	2,3858	11,9293	119,29
	648396	1296792	2,3778	11,8893	118,89
	Lote 1	648693	1297386	2,3789	11,8945
Laboratorio A	659303	1318606	2,4179	12,0899	120,89
	654770	1309540	2,4013	12,0065	120,06
	Lote 2	657584	1315168	2,4116	12,0583
Laboratorio A	664551	1329102	2,4372	12,1864	121,86
	651918	1303836	2,3908	11,9540	119,54
	Lote 3	662360	1324720	2,4292	12,1461
Laboratorio B	573917	1147834	2,1038	10,5190	105,19
	574665	1149330	2,1065	10,5329	105,32
	Lote 4	579076	1158152	2,1228	10,6140
Laboratorio C	431626	863252	1,5802	7,9014	79,01
	432520	865040	1,5835	7,9179	79,17
	Lote 5	431591	863182	1,5801	7,9008

Como se puede observar los tres lotes de muestras del Laboratorio A presentaron valores por encima de los límites establecidos en la USP 34. Cabe destacar que los cromatogramas obtenidos reflejaron una buena separación e integración. Los resultados del laboratorio B se encontraron dentro de los límites y los picos cromatográficos fueron bien definidos. Los resultados de las muestras del laboratorio C se encontraron por debajo de los límites establecidos. De acuerdo a estos resultados se decidió eva-

luar la concordancia entre los espectros de oxitocina estándar USP y el espectro del pico cromatográfico de oxitocina obtenido por el método descrito en el presente trabajo para las muestras provenientes de los laboratorios A, B y C. La Figura 8 muestra los espectros ultravioleta y los ángulos de concordancia (*match angle*) de la oxitocina estándar USP y la oxitocina contenida en las muestras de los diferentes laboratorios estudiadas. Para el laboratorio A, el ángulo de concordancia fue de 0,557; para el Laboratorio B de 2,456 y para el Laboratorio C de 6,994. El espectro de la muestra del laboratorio A concuerda casi en forma total con el espectro de la oxitocina USP, las muestras del laboratorio B y C mostraron una mayor divergencia a una longitud de onda aproximada de 230 nm. La muestra del laboratorio C presentó una mayor diferencia espectral con respecto al estándar oxitocina USP. Aunque no fue determinada las causas que originan estas desviaciones, recomendamos estudiar el origen de la materia prima utilizada en la elaboración de estos inyectables y relacionarlo con estos resultados.



**Figura 8. Estudio de concordancia entre los espectros del estándar de oxitocina USP y la oxitocina contenida en las muestras de los laboratorios A, B y C.**



## Conclusiones y recomendaciones

Se adecuó un método analítico para la determinación isocrática de oxitocina en inyectables en una Columna C<sub>18</sub> Spherisorb® 5 µ ODS 4,6 nm x 150 nm, con una Fase móvil (60:40) compuesta por una solución A de Fosfato Monosódico 0,1 M pH ≈ 4,5 y una solución B de ACN: H<sub>2</sub>O (1:1), longitud de onda 220 nm, volumen de inyección 200 µL, tiempo de corrida 13 min y una velocidad de flujo de 2,5 ml/min que permitió obtener resultados confiables en la identificación y cuantificación de oxitocina en inyectables. Los resultados presentados permiten el análisis cuantitativo de oxitocina en inyectables en tiempos menores al descrito en la Farmacopea USP 36 utilizando materiales y métodos accesibles en la industria farmacéutica, razón por la cual lo recomendamos como método rutinario.

Por otra parte, recomendamos utilizar un sistema de inyección con un *loop* mayor a 200 µL para mejorar los valores de precisión de la metodología analítica utilizando volúmenes iguales para concentraciones diferentes en la curva estándar utilizada, así como investigar la procedencia y calidad de las materias primas utilizadas en la elaboración de los diferentes inyectables de oxitocina comercializados en Venezuela a los fines de determinar la causa de las divergencias encontradas en el estudio de selectividad reportadas en el presente trabajo.

## Referencias bibliográficas

- Avilán ME. 2010. Trabajo de Ascenso a Profesor Asistente; Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- British Pharmacopeia. 2003. Department of Health and Social Security. Welsh office, Ministry of Health and Social Services of Northern Ireland.
- Calam D. 1978. Applications of chromatography in the standardization and control of biological products. *J Chromatography*. 167: 91-108.
- Chaibva FA, Walker RB. 2007. Development and validation of stability indicating analytical method for the quantitation of oxytocin in pharmaceutical dosage forms. *J Pharm Biomed Anal* 43(1):179-185.
- European Pharmacopeia. 2002. Fourth edition. Council of Europe. Strasbourg, France.
- Frei RW, Michel L, Santi W. 1976. Post-column fluorescence derivatization of peptides. Problems and potencial in high-performance liquid chromatography. *J Chromatography*. 126: 665-677.
- Goodman G, Rall TW, Nies AS, Taylor P. 1991. Fármacos que afectan la motilidad uterina. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 8<sup>va</sup> ed; Médica Panamericana. México. pp. 909-925.
- Karbiwnyk CM, Faul KC, Turnipseed SB, Andersen WC, Miller KE. 2008. Determination of oxytocin in a dilute IV solution by LC-MS. *J Pharm Biomed Anal*. 48(3): 672-677.
- Krummen K, Frei R. 1977. Quantitative analysis of non-peptides in pharmaceutical dosage forms by high-performance liquid chromatography. *J Chromatography*. 132: 429-436.
- Ohta M, Fukuda H, Kimura T, Tanaka A. 1987. Quantitative analysis of oxytocin in pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography. *J Chromatography*. 402: 392-395.
- Parker KL, Schimmer BP. Pituitary hormones and their hypothalamic releasing Hormones. En: Brunton L, editor. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11<sup>th</sup> edition. (monografía en CD-ROM) McGraw-Hill Companies, Inc.; 2006. Section XII Chapter 55.
- Regnault M. 2004. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), Análisis de Medicamentos. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. pp 199-251.
- Seitchik J, Castillo M. 1982. Oxytocin augmentation of dysfunctional labor. I. Clinical data. *Am J Obstet Gynecol*. 144 (8): 899-905.
- Seitchik J, Castillo M. 1983. Oxytocin augmentation of dysfunctional labor. II. Uterine activity data. *Am J Obstet Gynecol*. 145 (5): 526-529.
- The Merck Index. 1983. An Encyclopedia of Chemical, Drugs, and Biologicals, Merck & Co., Inc., N.J., U.S.A. 10<sup>o</sup> Ed.
- The United States Pharmacopeia (USP) 34 National Formulary 29. The United States Pharmacopeia Convention 2012. National Publishing. Philadelphia:USA.
- Waters Corporation. Peak Purity Analysis. Waters 996. Photodiode Detector. Performance Perspectives. 508: 478-2000.