

Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de disolventes residuales por Espacio de Cabeza Estático – Cromatografía Gaseosa Capilar en policosanol

Bárbara Luna Saucedo, Luis Gonzalez Bueno, Esperanza Rodríguez, Tamara Bello, Bárbara Acosta, Javier Mosquera Sierra, Lisbet Benavides y Odila Quintana.

Departamento de Aseguramiento de la Calidad, Dirección de Producción, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Portal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 30 de agosto de 2004. Aceptado: 15 de julio de 2005.

Palabras clave: residuos de disolventes, análisis por Espacio de Cabeza, Cromatografía Gaseosa Capilar.
Key words: residuals of solvents, analysis for headspace, Gas Chromatography capillary.

RESUMEN. En el proceso de obtención de policosanol son utilizados los disolventes n-hexano y acetona que son eliminados posteriormente en las etapas de secado correspondientes. El objetivo de este trabajo fue desarrollar y validar un método analítico que permitiera la determinación de posibles residuos de disolventes en lotes de policosanol, utilizando la técnica de Espacio de Cabeza Estático - Cromatografía Gaseosa Capilar (ECE-CGC). Se optimizaron los parámetros de operación del cromatógrafo de gases, así como los del análisis por Espacio de Cabeza: temperatura de equilibrio entre las fases: 30 °C, temperatura de la línea de transferencia: 150 °C, temperatura de la válvula de conmutación: 120 °C, tiempo de equilibrio entre las fases: 10 min, tiempo de inyección: 2 s y flujo de gas de arrastre (argón): 5 mL/min. Los criterios fundamentales de validación estudiados fueron: linealidad, proporcionalidad, precisión en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, exactitud, sensibilidad y límite de detección. Los criterios de aceptación en todos los casos fueron tomados de la Sección Catalana de Normas de Buena Fabricación y Control de Calidad (Validación de Métodos Analíticos). En el estudio de linealidad, para el hexano de 39,5 a 118,5 ppm y para la acetona de 47,52 a 42,56 ppm, se encontraron coeficientes de variación de los factores de respuesta inferiores al 5 % y valores aceptables para la varianza del error experimental total y la desviación estándar de la pendiente, lo que denota una buena linealidad. En cuanto a la proporcionalidad, se comprobó que el sistema no presenta sesgo. Los coeficientes de variación fueron menores del 2 %, lo que indicó una precisión adecuada del método analítico en condiciones de repetibilidad, e igual resultado se obtuvo para el caso de la reproducibilidad. Los residuos de acetona y hexano en las muestras analizadas estuvieron por debajo del límite de detección en ambos casos (3,37 ppm para el hexano y 25,79 ppm para la acetona).

ABSTRACT. In the process of policosanol obtainment the solvents n-hexane and acetone are used and they are eliminated later on in the corresponding drying stages. The objective of this work was to develop and to validate an analytical method that allowed the determination of residuals of solvents in policosanol lots using the technique of HeadSpace Static - Gas Chromatography Capillary. The parameters of operation of the gas chromatograph as well as those of the analysis for headspace, were optimized: balance temperature among the phases: 30 °C; temperature of the transfer line: 150 °C; temperature of the commutation valve: 120 °C; time of balance among the phases: 10 min; time of injection: 2 s and flow of haulage gas (argon): 5 mL/min. The validation criteria were the following: linearity, proportionality, accuracy, sensibility and precision in repeatability and reproducibility conditions and the limits of detection. In all cases acceptance criteria were the same as the Catalan Section of Standards of Good Manufacture and Control of Quality (Validation of Analytical Methods). In the linearity study the coefficients of variation of the re-

sponse factors were lower than 5 % and acceptable values for the variance of the total experimental error and the deviation of standard of the slope, which denotes a good linearity. In the proportionality it was proven that the system doesn't present any bias. The coefficients of variation were smaller than 2 % what indicated an appropriate precision of the analytic method and equal result was obtained for the case of the reproducibility. The residuals of acetone and hexane in the analyzed samples are below the limits of detection in both cases (3,37 ppm for the hexane and 25,79 ppm for the acetone).

INTRODUCCION

La aplicabilidad de un método analítico dado tiene que asegurarse sobre la base de un buen diseño y un cuidadoso estudio de validación del método.^{1,2} La validación no implica que el método esté libre de errores, solo confirma que es conveniente para un propósito determinado y debe quedar totalmente registrado en el Manual de Calidad, de forma tal que cualquier analista pueda utilizarlo sin dificultad. Los métodos y procedimientos utilizados tienen que ser validados a través del examen y el aporte de evidencias objetivas que demuestren que satisfacen los requisitos particulares para los cuales están destinados.²⁻⁴ En algunos casos, es necesario utilizar métodos que no han sido convenientemente normaliza-

dos por lo que deben ser validados apropiadamente antes de ser utilizados.^{5,6} La validación del método establece que sus características son adecuadas para el uso pensado, y asegura la calidad y fiabilidad del método (Alvarez M. Acreditación de laboratorios analíticos (Apuntes para un curso de postgrado), Ciudad de La Habana, 1997).

La validación se realiza a través de un conjunto de experimentos, usando las condiciones específicas del método, el mismo tipo de matriz y empleando muestras dopadas. Esto trae consigo la evaluación de varios parámetros como exactitud, precisión en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, linealidad, sensibilidad, límites de detección y cuantificación, recobrado y especificidad (selectividad).¹ Las definiciones y los procedimientos para el cálculo de estos parámetros están adecuadamente descritos en muchas publicaciones relacionadas con el análisis biomédico y farmacéutico.⁷⁻¹¹ Para productos industriales tales como medicamentos, las regulaciones exigen la identificación de impurezas a niveles de 0,1 % para la mayoría de los compuestos, por ello, debe tenerse en cuenta qué técnica permite esto en cuanto a límites de detección y selectividad.¹² En la industria farmacéutica, la validación de un método analítico es indispensable para el registro del producto, muchos de los principios, procedimientos y requisitos de la validación son comunes.¹³⁻¹⁶

Los disolventes residuales en productos farmacéuticos son productos químicos orgánicos volátiles que se utilizan o producen durante la fabricación de principios activos. Puesto que los disolventes residuales no producen ningún beneficio terapéutico, deben ser eliminados en lo posible para satisfacer las exigencias del producto, las Buenas Prácticas de Fabricación u otro requisito relacionado con la calidad. Los productos farmacéuticos no deben tener concentraciones de disolventes residuales superiores a las recomendadas en las regulaciones de seguridad.¹⁷

En el proceso de obtención de policosanol y del extracto purificado de cera de caña son utilizados los disolventes hexano y acetona que son eliminados posteriormente en las etapas de secado correspondientes. La acetona es un disolvente clase 3, clasificado como de pocos efectos tóxicos para la salud humana. Para este tipo de disolvente son

aceptables concentraciones menores de 5 000 ppm ó 0,5 % según la Farmacopea Europea 2000. El hexano es clasificado como disolvente clase 2, de toxicidad moderada, su uso debe ser limitado y en caso de ser usado, la concentración límite permisible es de 290 ppm.¹⁷ Teniendo en cuenta las condiciones de secado del policosanol y que una de sus especificaciones de calidad es que la pérdida por desecación debe ser < 1 %, se puede predecir que las concentraciones de los disolventes residuales en él nunca van a ser cercanas a las concentraciones referidas de hexano y acetona.

La determinación de residuos de disolventes (acetona y hexano), presentes en el proceso de producción de policosanol y extracto purificado de cera de caña, se realiza por la técnica de Espacio de Cabeza Estático-Cromatografía de Gases Capilar (ECE-CGC), esta técnica consiste en la extracción con gas de uno ó más componentes de una matriz líquida o sólida y su posterior análisis cromatográfico en la fase gaseosa.^{18,19} Las principales ventajas de la extracción con gas respecto a la extracción con disolventes son las siguientes: se elimina la presencia del pico del disolvente en el cromatograma de la muestra analizada, el cual, en muchas ocasiones, es una causa de interferencia en el análisis de sustancias volátiles; al ser el gas un medio extractivo más puro en comparación con los disolventes líquidos más comunes, el analito aislado resulta menos contaminado con otros componentes presentes en la muestra; el extracto obtenido con gas no necesita ser concentrado de manera convencional, como es común en otras variantes extractivas que emplean disolventes.²⁰⁻²² Por esta razón, no existen pérdidas cuantitativas en el estudio de sustancias volátiles; el extracto gaseoso será siempre más afín a la cromatografía en fase gaseosa, que cualquier extracto de características líquidas y por último, el gas es un agente extractivo mucho más selectivo que cualquier disolvente, en el aislamiento de sustancias volátiles de matrices complejas.^{18,19}

Según las normas de buena fabricación y control de calidad de productos farmacéuticos, la validación debe aplicarse no solo a los procesos de fabricación, sino también, a los métodos de análisis y control.^{17,23,24} El objetivo de este trabajo

fue desarrollar y validar un método analítico para la determinación de posibles residuos de disolventes en lotes de producción de policosanol utilizando la técnica de Espacio de Cabeza Estático-Cromatografía Gaseosa Capilar (ECE-CGC).

MATERIALES Y METODOS

Todos los reactivos empleados fueron de calidad analítica, con 99,9 % de pureza, Merck.

Las determinaciones se realizaron en un cromatógrafo de gases con detector de ionización por llama, modelo GC-14 (SHIMADZU, Japón) en condiciones óptimas (Tabla 1) con una columna Wide Bore de gel de sílice fundida con fase inmobilizada DB-20 (Lc = 30 m, d.i. = 0,53 mm, d_t = 3 mm). El flujo de gas portador (argón) fue de 5 mL/min, las temperaturas de la columna (isotérmica), del inyector y del detector fueron 40, 160 y 200°C respectivamente.

Calibración

La gráfica de calibración se construyó a partir del análisis por ECE-CGC de forma separada para el hexano y la acetona, con muestras de concentración conocida (tres réplicas por punto). La respuesta cromatográfica (áreas del pico), se correlacionaron frente a la concentración de hexano o acetona correspondiente.

Las disoluciones patrones se prepararon adicionando con pipetas graduadas diferentes volúmenes de hexano o acetona a volúmenes de 50 mL que contenían aproximadamente 25 mL de disulfuro de carbono, se enrasaron con este y se agitaron para homogeneizar (Tabla 2).

Posteriormente, una muestra de policosanol fue llevada a peso constante en estufa de vacío a 50 °C para garantizar que estuviera libre de hexano y acetona. Las réplicas se pesaron en balanza analítica (Mettler modelo AE-240) en cinco viales de 20 mL y se sellaron herméticamente. A través del sello y con una jeringuilla microlítica de 10 µL, se introdujo en cada uno de ellos, una alícuota de 4 µL de cada una de las disoluciones de concentración conocida anteriormente preparadas. La adición de la alícuota de hexano o acetona a la muestra se realizó introduciendo la punta de la jeringuilla en el seno de la muestra sólida y agitando posteriormente los viales para homogeneizar el contenido.

Tabla 1. Parámetros óptimos de operación para el análisis por Espacio de Cabeza.

Parámetros	Valor
Temperatura de equilibrio entre las fases.	30 °C
Temperatura de la línea de transferencia.	150 °C
Temperatura de la válvula de conmutación.	120 °C
Tiempo de equilibrio entre las fases.	10 min
Tiempo de inyección.	2 s
Flujo de gas de arrastre (argón).	5 mL/min

Tabla 2. Disoluciones patrones de hexano y acetona.

No.	Hexano		Acetona	
	(ppm)	(mL)	(ppm)	(mL)
1	39,5	1,5	47,52	1,52
2	52,7	2,0	63,36	2,0
3	79,0	3,0	95,04	3,0
4	92,3	3,5	110,88	3,5
5	118,5	4,5	142,56	4,5

Análisis de la muestra

Se pesó 1g de muestra de policosanol en balanza analítica de manera directa en un vial de 20 mL. Se selló herméticamente y se dejó desorber por 10 min. Posteriormente a través del automuestreador K-MAS 5 (KoniK, España) configurado para Espacio de Cabeza Estático se tomó una alícuota de 0,2 μ L, de la fase vapor de policosanol y se analizó por ECE-CGC en idénticas condiciones que las muestras de calibración.

Análisis cualitativo

La presencia de hexano o acetona se comprobó mediante la comparación de los tiempos de retención a los que se detectan estos disolventes en una muestra de policosanol sin dopar y en una muestra dopada, bajo condiciones idénticas de separación (Fig. 1).

En el cromatograma, el primer pico de izquierda a derecha correspondió a la acetona que tiene un tiempo de retención de 0,807 y el segundo, al hexano con un tiempo de retención de 1,133. No se detectó señal visible de estos disolventes en el cromatograma de la muestra sin dopar.

Precisión^{2,5,6}

Previo a los cálculos correspondientes de los criterios fundamentales de la validación, se realizó la eliminación de los valores de área bajo la curva que aportaban diferencias significativas, mediante la

décima de Dixon. Con los que no se rechazaron, se procedió a calcular los coeficientes de variación de la repetibilidad, reproducibilidad, entre otros.

Repetibilidad del método

La repetibilidad se evaluó por el análisis de seis réplicas independientes por el método que se valida, en las que se determinó el área bajo la curva de la respuesta cuando se analizó una muestra dopada con 79 ppm de hexano y 95,04 ppm de acetona, por el mismo técnico en el mismo día y con el mismo equipo. El resultado se expresó como el coeficiente de variación en por ciento, que fue menor que el 2 % en ambos casos, 0,61% para la acetona y 0,15% para el hexano.

Precisión intermedia

La precisión intermedia se determinó por un mismo técnico en 5 d consecutivos. Se realizó la evaluación estadística de los resultados para un 95 % de confiabilidad. La reproducibilidad como el coeficiente de variación se expresó en por ciento.

Exactitud

Para determinar la exactitud del método, se prepararon 10 réplicas que fueron llevadas a peso constante en estufa al vacío a 50 °C, para garantizar que no hubiera presencia de disolventes, en la proporción del punto central de la curva de calibración en cada caso, 79 ppm para el hexano y 95,04 ppm para la acetona. Se expresó como el porcentaje que representa el área bajo la curva de hexano y acetona cuantificado, con respecto al valor obtenido de la interpolación de la recta de linealidad en el punto central

RESULTADOS Y DISCUSION

Linealidad^{2,5,6}

En la determinación de la linealidad para la acetona y el hexano, los coeficientes de correlación (r) fueron superiores al límite de aceptación 0,99, lo que indica una correlación lineal positiva entre las variables x y y con una probabilidad superior al 99,9 % en ambos casos (Tablas 3 y 4).

Prueba de linealidad

Como criterio para una buena linealidad del sistema se consideró el coeficiente de variación de los factores de respuesta (CV_p) menor del 5 %, que se cumplió tanto en el caso de la acetona como del hexano, por lo que se puede considerar que el sistema es lineal en todo el intervalo de concentraciones estudiadas

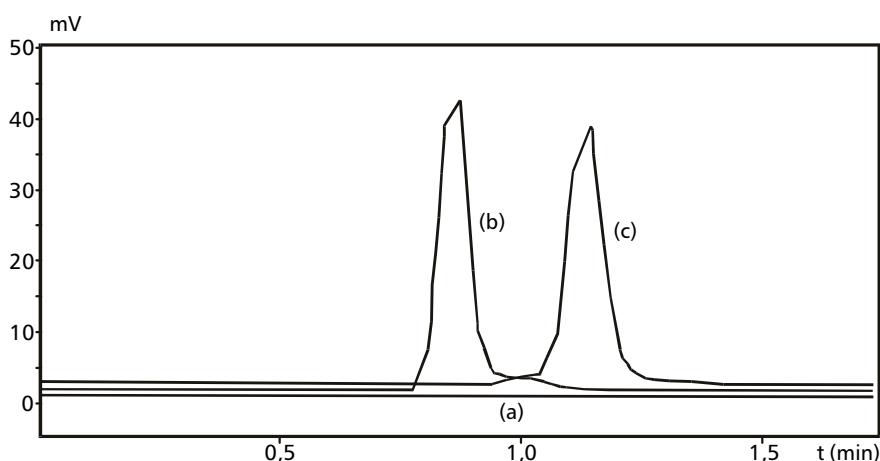

Fig. 1. Superposición de los perfiles de una muestra de policosanol sin dopar (a) y una muestra dopada con 79 ppm de hexano (b) y 95,04 ppm de acetona (c) por separado.

Tabla 3. Resultados correspondientes a la determinación de la linealidad para la acetona

Concentración	Area promedio	Factor de respuesta
47,52	85 633	1 802,04
63,36	115 022	1 815,38
95,04	169 267	1 781,01
110,88	195 599	1 764,06
142,56	235 714	1 653,44
r = 0,997 09		
y = 137 09 + 1595,0 x		
$\bar{f} = 1 763,86$	DS = 64,316	CV _f = 3,65 %

Tabla 4. Resultados correspondientes a la determinación de la linealidad para el hexano.

Concentración	Area promedio	Factor de respuesta
39,5	56 168	1 421,97
52,7	68 514	1 300,07
79,0	109 184	1 382,07
92,3	124 224	1 345,87
118,3	164 348	1 389,24
r = 0,998 29		
y = - 1 561 + 1 388,8x		
$\bar{f} = 1 367,844$	DS = 46,5456	CV _f = 3,4 %

para cada caso, además de la significación de la varianza de la pendiente.

Significación de la varianza de la pendiente

Se analizó la significación estadística de la varianza de su pendiente S_b^2 , a partir de la cual, se determinaron las desviaciones estándar S_b y relativa $S_{b,rel}$ (%), así

como los límites de confianza de la pendiente. A menor varianza de la pendiente mejor linealidad² (Tabla 5).

Prueba de proporcionalidad

El valor de a, intercepción con el eje de las ordenadas u ordenada en el origen indica el error sistemático del método. Se calculó la varianza del intercepto S_a^2 a partir de la cual se determinó la desviación estándar

S_a , la desviación estándar relativa $S_{a,rel}$ (%) y los límites de confianza del intercepto (Tabla 6).

El valor cero quedó incluido en los límites de confianza del intercepto, por lo que se puede considerar que el método analítico no presenta sesgo y se cumple la condición de proporcionalidad.^{5,6}

Repetibilidad

La repetibilidad se expresa como el coeficiente de variación en por ciento, y fue menor que el 2 % en ambos casos, 0,61 % para la acetona y 0,15 % para el hexano.

Precisión intermedia

En ambos casos, la precisión intermedia fue menor que el 2 %, 0,29 % para el hexano y de 0,99 % para la acetona.

Exactitud

La exactitud fue expresada como el porciento que representa el área bajo la curva de hexano y acetona cuantificados, con respecto al valor obtenido de la interpolación de la recta de linealidad en el punto central. Como las t experimentales (0,025 6 para la acetona y 0,087 4 para el hexano), calculadas a partir de la desviación estándar, número de determinaciones, valor medio de las determinaciones y el valor tomado como real, son menores que la t tabulada(2,228) para p = 0,05 y n - 1 grados de libertad, significa que los valores encontrados experimentalmente y los tabulados no son estadísticamente diferentes y el método tiene la exactitud requerida tanto para la determinación de acetona como para la de hexano.

Límite de detección^{2,5,6}

El límite de detección fue expresado como $3|a| \cdot b^{-1}$, en las mismas unidades que las abscisas en la recta de calibración.

Para la acetona, el límite de detección fue de 25,78 ppm y para el hexano de 3,37 ppm. Según la Farmacopea 2000, la acetona es clasificada como un disolvente clase 3, de

Tabla 5. Significación de la varianza de la pendiente.

Parámetro	Hexano	Acetona
Varianza de la pendiente S_b^2	3 307,74	4 947,33
Desviación estándar S_b	57,51	70,34
Desviación estándar relativa $S_{b,rel}$ (%)	4,14	4,40
Límites de confianza de la pendiente	1 388 ± 182,89	1 595 ± 223,67

Tabla 6. Resultados del estudio de proporcionalidad.

Parámetro	Hexano	Acetona
Varianza del intercepto S_a^2	21 892 416,47	47 418 187,03
Desviación estándar S_a	4 678,93	6 886,09
Desviación estándar relativa $S_{a,rel}$ (%)	299,76	50,23
Límites de confianza del intercepto	1 560,9 ± 14 879	13 709 ± 21 897,75

pocos efectos tóxicos para la salud humana y para este tipo de disolvente son aceptables concentraciones menores de 5 000 ppm. El hexano es clasificado como disolvente clase 2, de toxicidad moderada, su uso debe ser limitado y en caso de ser usado, la concentración límite permisible es de 290 ppm. Las muestras analizadas tuvieron concentraciones de estos disolventes por debajo de los límites de detección de cada uno de ellos, los cuales, a su vez, se encuentran muy por debajo de los límites de aceptación planteados para ambos casos.

CONCLUSIONES

Se desarrolló y validó un método analítico para la determinación de residuos de disolventes (acetona y hexano) en lotes de policosanol utilizando la técnica de Espacio de Cabeza Estático-Cromatografía Gaseosa Capilar (ECE-CGC), así mismo quedó demostrada la capacidad del método para obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración de analito en la muestra, dentro de los intervalos de concentraciones utilizados. Presenta a su vez, una repetibilidad, reproducibilidad y exactitud satisfactorias. Los límites de detección calculados, satisfacen las

especificaciones de calidad del producto.

BIBLIOGRAFIA

1. Mehta C.A. Quality management in drug analysis. **Analyst**, **122**, 84R, 1997.
2. Castro M., Gascón S., Pujol M., Sans J. M. y Vicente L., Validación de métodos analíticos, A.E.F.I., Sec. Catalana, Comisión de Normas de Buena Fabricación y Control de Calidad, España, 1989.
3. Byrialsen K., Kristiasen J., Christensen J. M. Trends in quality assurance of metal determination in clinical chemistry. **Analyst**, **123**, 7-12, 1998.
4. IUPAC. **Appl. Spectrosc.**, **31**, 348, 1977.
5. Guerra J., Finkelson, M. J. Validation of analytical methods by FDA laboratories. **Pharmaceutical Technology**, March, 74-84, 1986.
6. Inman E. L. *et al.* General method validation Guidelines for Pharmaceutical Samples. **Journal of Chromatographic Science**, **25**, 252-6, 1987.
7. Clarke G.S., **J. Pharm. Biomed. Anal.**, **12**, 643, 1994.
8. Carr G.P., and Wahlich, J.C., **J. Pharm. Biomed. Anal.**, **8**, 613, 1990.
9. Edwardson P. A. D., Bhaskar, G., and Fairbrother, J. E., **J. Pharm. Biomed. Anal.**, **8**, 929, 1990.
10. Green J.M., **Anal. Chem.**, **68**, 305A, 1996.
11. Wilson T.D., **J. Pharm. Biomed. Anal.**, **8**, 389, 1990.
12. Mehta A.C., **J. Clin. Pharm. Ther.**, **14**, 465, 1989.
13. Berridge J. C., **J. Pharm. Biomed. Anal.**, **14**, 7, 1995.
14. International Conference on Harmonisation (ICH): Note for Guidance on Impurities in New Drug Substances, Commission of the European Communities, (Brussels), 1995.
15. Garcés J., Mariné A. Evaluación y control de calidad de los métodos de análisis químico. V. Comparación de métodos analíticos. **Ciencia e Industria Farmacéutica**, **7**, 373-9, 1988.
16. Loo M.L., Taylor M., Kantrowitz J. Statistica evaluation of Quality Control Tests. **Pharmaceutical Technology**, 108-19, September, 1988.
17. Real Farmacopea Española, 1999.
18. Molnar I., **LC-GC Int.**, **9**, 800, 1996.
19. Molnar I., **LC-GC Int.**, **10**, 32, 1997.
20. Jenke D.R., **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, **19**, 719, 1996.
21. Jenke D.R., **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, **19**, 737, 1996.
22. Jenke D.R., **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, **19**, 1873, 1996.
23. Lecompte D. Validation d' une méthode de dosage par chromatographie liquide **S.T.P Pharma**, **2**, 843-9, 1986.
24. Garfield F.M. Laboratory quality assurance - A rationale for credibility. **Trends in Analytical Chemistry** **4**, 162-6, 1985.