

COMUNICACIÓN CORTA

Prueba de límite para n-hexano residual en policosanol por Espacio de Cabeza Estático -Cromatografía de Gases

Ernesto J. Méndez Antolín, Víctor L. González Canavaciolo, Yaisme Balcinde Quiñónez,* Esperanza Rodríguez Cruz* y Alexis González Pedroso.*

Centro de Productos Naturales, Calle 198 entre Avenidas 19 y 21, Reparto Atabey, Playa, Ciudad de La Habana. Correo electrónico: victor.gonzalez@cnic.edu.cu, *Dirección de Producción, Agrupación 3, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 12 de junio de 2009. Aceptado: 5 de octubre de 2009.

Palabras clave: prueba de límite, policosanol, n-hexano residual, espacio de cabeza, Cromatografía de Gases.
Key words: limit test, policosanol, residual n-hexane, headspace, Gas Chromatography.

Como parte del proceso de obtención de un ingrediente activo, se deben tratar de eliminar en la mayor medida posible los disolventes empleados, pues sus restos constituyen impurezas potencialmente tóxicas. Por este motivo, los organismos reguladores de la Industria Farmacéutica tienen definidos los contenidos máximos permisibles para los disolventes residuales de los ingredientes activos utilizados en la producción de medicamentos, entre los cuales el n-hexano, empleado en la obtención del policosanol, presenta un límite de 290 ppm.¹

Las pruebas de límite, empleadas para confirmar si la concentración del analito es inferior o superior que la previamente establecida, se encuentran entre los métodos analíticos destinados a determinar impurezas.²⁻⁴ Como parte del continuo perfeccionamiento de los sistemas de control de calidad que deben realizar los productores en esta industria, se propone en el presente trabajo una prueba de límite por Espacio de Cabeza Estático (ECE)-Cromatografía de Gases (CG) para determinar el contenido de n-hexano en policosanol. Esta prueba de límite es similar a la propuesta en las Farmacopeas para disolventes residuales,² pero fue adaptada a las particularidades de este ingrediente activo. El empleo de nuevas condiciones operacionales en esta prueba permitió lograr una mayor sensibilidad que la del método anterior,⁵ también basado en el empleo de la ECE-CG. Por otra parte, tanto la implementación como la validación de esta prueba resultan mucho más simples que las del método anterior, ya que a diferencia de aquel, la presente prueba no pretende la cuantificación exacta del analito.

Para preparar la muestra de ensayo (ME) se pesó 1,000 g de policosanol en un vial que se selló herméticamente, se inyectó 1 μ L de disulfuro de carbono (Merck, Alemania) a través del sello en el seno del sólido y se homogeneizó por agitación manual durante 1 min ($n = 5$). Para preparar la muestra de referencia (MR) se siguió el procedimiento anterior, pero se sustituyó el disulfuro de carbono por una disolución de n-hexano (Riedel-de-Haen, Alemania) a 1,32 μ g/ μ L en disulfuro de carbono.

Se utilizó un equipo configurado para ECE modelo K-MAS 5, acoplado al CG 4000B (Konik, España) con detector de ionización por llama y sistema de cómputo. Las condiciones operacionales se ajustaron con vistas a obtener la mayor respuesta cromatográfica para el n-hexano mediante el análisis de varias MR. Así, se establecieron: 80 °C en el vial y 120 °C en la línea de transferencia y en la válvula de conmutación. Los tiempos de equilibrio, de pre-inyección y de inyección fueron: 10, 4 y 0,3 min, respectivamente, y la presión fue de 137,9 kPa. Se empleó una columna BP-1 (30 m x 0,53 mm d.i. y 3,0 mm de espesor de película, SGE, EUA) a 30 °C durante 1 min, con un aumento de 4 °C/min hasta 200 °C. Los flujos de gas portador (He), H₂ y aire fueron: 4, 38 y 280 mL/min, respectivamente. El inyector y el detector se calentaron a 160 y 200 °C, respectivamente. La limpieza del sistema se verificó con inyecciones intercaladas de un blanco, que fue un vial con 1 g de sulfato de sodio anhidro (Merck, Alemania), al cual se le añadió 1 μ L de disulfuro de carbono y se homogeneizó por agitación manual durante un minuto.

El criterio de identificación fue el tiempo de retención (t_r) con su intervalo de confianza (IC):

Correspondencia:

Dr. Víctor L. González Canavaciolo

Centro de Productos Naturales, Calle 198 entre Avenidas 19 y 21, Reparto Atabey, Playa, Ciudad de La Habana, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: victor.gonzalez@cnic.edu.cu

$$IC = t_r(\text{medio}) \pm t x DE/n^{1/2} \quad (1)$$

donde:

DE desviación estándar.

n número de réplicas.

t corresponde a la distribución de Student para n-1 y P = 0,05.

Para estudiar la linealidad del método se tomaron: 1; 5; 10; 15 y 20 μL de una disolución de n-hexano en disulfuro de carbono a 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, los cuales se añadieron en viales con 1 g de sulfato de sodio anhidro y se agitó durante 1 min manualmente (n = 3). A partir de las concentraciones de n-hexano evaluadas: 0,01; 0,05; 0,10; 0,15 y 0,20 ppm (x) y de las áreas cromatográficas obtenidas (y) se calculó la ecuación de regresión (2) por el método de los mínimos cuadrados, con intervalos de confianza para un 95 % de confiabilidad:

$$y = (14\,080 \pm 582)x + (14 \pm 71). \quad (2)$$

El coeficiente de correlación ($r = 0,997\,6$), así como los coeficientes de variación (CV) de los factores de respuesta (3,87 %) y de la pendiente (1,91 %) cumplieron con sus límites de aceptación ($> 0,99$; $< 5\%$ y 2% , respectivamente), mientras que el intervalo de confianza del intercepto incluyó al cero, por lo que no hubo sesgo. Al cumplirse estos criterios se demostró la linealidad del método en el intervalo de concentraciones evaluadas, en el cual se incluyen las concentraciones de n-hexano residual que usualmente presentan los lotes de policosanól, como se apreciará más adelante.

Con el objetivo de determinar las concentraciones de n-hexano en lotes de policosanól recientemente fabricados se escogieron tres al azar (030100206, 030110206 y 030120206) y se analizaron sus ME el mismo día en que se realizó el estudio de linealidad. Al interpolar en la curva de calibración las áreas cromatográficas obtenidas, se obtuvieron concentraciones de n-hexano ($\leq 0,04$ ppm) muy inferiores al máximo permisible, índice de que la etapa de secado del policosanól es adecuada.

Teniendo en cuenta las bajas concentraciones calculadas anteriormente en los lotes analizados, se impuso

como límite para este método 1,32 ppm. Siendo esta última la concentración que aporta a la MR la alícuota añadida de la disolución de n-hexano, se puede considerar que si la respuesta cromatográfica promedio obtenida con las ME es menor que la mitad de la respuesta promedio obtenida con las MR, entonces el contenido de este disolvente en la muestra analizada es $< 1,32$ ppm. Al ser analizado de esta forma el lote 030120206 se obtuvo una respuesta cromatográfica promedio con las ME (Tabla 1) que fue aproximadamente 26,5 veces menor que la respuesta promedio obtenida con las MR. Esto, además de indicar una concentración de n-hexano muy inferior a 1,32 ppm, lo que coincide con la determinación realizada por la curva de calibración, es un índice de la gran sensibilidad del método ante pequeños incrementos de concentración, propiedad evidenciada anteriormente en el ensayo de linealidad, la cual es de esencial importancia en la determinación de disolventes residuales.

En los perfiles cromatográficos obtenidos al analizar estas ME (Fig. 1), la señal del n-hexano apareció dentro del IC calculado con las MR [(6,19 \pm 0,19) min] sin interferencias de otros compuestos, lo cual se comprobó por Espectrometría de Masas, según se recomienda en la USP 27.² Los CV de las respuestas obtenidas (Tabla 1) fueron inferiores al máximo permisible para este tipo de análisis (15 %),² lo que evidencia la precisión de este método. Por otra parte, la señal del n-hexano en estas ME fue aproximadamente 35 veces mayor que el nivel medio de ruido, relación satisfactoria, ya que se puede considerar como Límite de Detección a la concentración que provoca una señal igual a tres veces el nivel medio de ruido.² Teniendo en cuenta lo anterior, así como la concentración previamente calculada de n-hexano en este lote, se pone en evidencia que el Límite de Detección del presente método es $< 0,04$ ppm, mucho menor que el del método anterior (3,37 ppm).⁵ Esto puede deberse fundamentalmente a las condiciones operacionales actuales, particularmente a la mayor temperatura del vial. Por todo lo anterior, el presente método pudiera ser empleado, una vez que se haya validado, como parte del sistema de control de calidad del policosanól

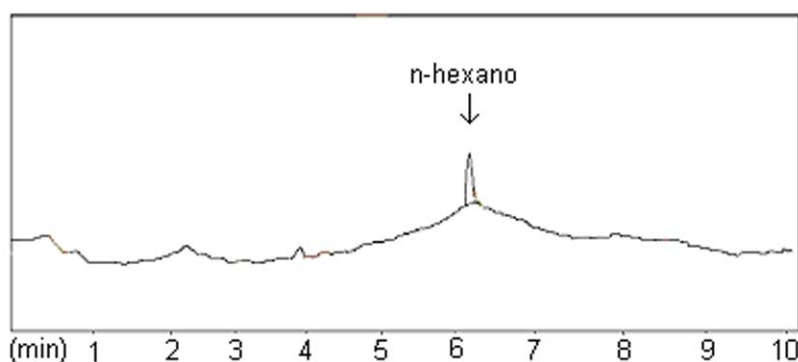


Fig. 1. Perfil cromatográfico parcial obtenido al analizar el lote 030120206 de policosanól.

Tabla 1. Resultados de la prueba de límite al lote 030120206 de policosanól.

Muestra	Respuesta ($\mu\text{V} \cdot \text{s}$)					Respuesta promedio ($\mu\text{V} \cdot \text{s}$)	DE	CV (%)
ME	518	551	516	574	618	555	42	7,57
MR	14517	14370	14929	14778	15191	14757	326	2,21

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Topic Q3C Impurities: Residual Solvents, Note for guidance on impurities: Residual solvents. London: EMEA; 1997: p.7.
2. The United States Pharmacopoeia 27 and National Formulary 22 (USP27-NF22) [Monograph on CD ROM]: The United States Pharmacopoeial Convention, Inc USA, 2004.
3. Australian Government. Department of Health and Ageing Therapeutic Goods Administration. Starting Material Analytical Procedure Validation, Sidney: Australian Government. 2006: p. 5.
4. Ministerio de Salud Pública. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos, Regulación 41. Validación de Métodos Analíticos, La Habana: Ministerio de Salud Pública. 2007: p. 9.
5. Luna B, González L, Rodríguez E, Bello T, Acosta B, Mosquera J, *et al.* Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de disolventes residuales por ECE-CG capilar en policosanol. Revista CENIC Ciencias Químicas. 2005; 36 (3):143-147.