

Validación de una metodología analítica para la determinación de acetaminofén en procesos de limpieza

Carmen Zoraya Estévez*, Freddy Armando Quiroga*, Jaime H. Rojas*¹ y Humberto Hernández**

Resumen

En el presente escrito se consignan aspectos relacionados con la validación de una metodología analítica aplicada a la evaluación de la eficiencia de un proceso de limpieza en las cabinas de pesado de materias primas de una industria farmacéutica. Esta validación se hace necesaria, dado el incremento de equipos multiuso-multiproducto en la industria farmacéutica, para lo cual se estandarizó un método de muestreo y se establecieron los parámetros que posteriormente fueron validados con base en la cantidad máxima permisible residual de un fármaco seleccionado de acuerdo con criterios científicos.

Palabras clave: Validación de metodologías analíticas - Procesos de limpieza - Acetaminofén - Cantidad máxima permisible - Cromatografía líquida de alta eficiencia - Métodos de muestreo aplicados a procesos de limpieza.

Summary

Validation of an analytical methodology for determination of acetaminophen in cleaning processes

In this article, aspects related with the validation of an analytical methodology applied to a cleaning process in the booths used for the raw materials weighing of a pharmaceutical industry are present. Nowadays, due to the increment in the use of multiuse-multiproduct equipments in the pharmaceutical industry, the analytical methodologies must be validated and therefore, a sampling method has been validated. The parameters validated were settled down according to the permissible residual maximum quantity of a drug selected according to scientific methods.

Key words: Analytical methodologies validation - Cleaning processes - Acetaminophen - Permissible maximum quantity - High performance liquid chromatography - Sampling methods applied to cleaning processes.

Introducción

La validación de procedimientos de limpieza de equipos empleados en la manufactura de productos farmacéuticos ha recibido gran interés

tanto en la industria farmacéutica como en las autoridades regulatorias con el fin de minimizar el riesgo de contaminación cruzada en dichos

Recibido para evaluación: Abril 8 de 2003
Aceptado para publicación: Noviembre 30 de 2003

* Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, A.A. 25479, Bogotá, Colombia.

*¹ E-mail: jhrojasb@unal.edu.co

** Laboratorio Farmacéutico Boehringer Ingelheim, Bogotá, Colombia.

productos (1-12). El incrementado uso de equipos multiuso y multiproducto permite que residuos provenientes de procesos de limpieza puedan tener un impacto significativo en la calidad del producto fabricado subsecuentemente en el mismo equipo. Por esto es importante aplicar procedimientos de limpieza que aseguren la eliminación o por lo menos la reducción hasta límites permisibles del producto que acaba de procesarse. Los estudios de validación de limpieza deben ser conducidos siguiendo un protocolo de validación, en el cual la metodología analítica es un factor clave en el desafío del procedimiento de limpieza. En consecuencia, es necesario validar la metodología analítica para identificar y cuantificar el analito residual de manera exacta y reproducible, mediante un método sensible y específico (2-10).

Este trabajo se desarrolló para validar una metodología analítica útil para cuantificar residuos remanentes luego de un procedimiento de limpieza y no considera aspectos relacionados con el procedimiento de limpieza evaluado.

Teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas del analito residual al proceso de limpieza se seleccionó como técnica de análisis la cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa con detector UV. El analito residual seleccionado fue acetaminofén, el cual se seleccionó con base en criterios de peor caso para procedimientos de limpieza.

Parte experimental

Materiales

Equipos: Bomba Merck-Hitachi L-7100, automuestreador Merck-Hitachi AS-2000A, horno Merck-Hitachi L-7300, detector UV-VIS Merck-Hitachi L-4250 e integrador Shimadzu C-R4A Chromatopac, espectrofotómetro UV-VIS Hewlett Packard 8453 - VECpra XM -

Serie 4, potenciómetro Schott Geräte pH-Meter CG840B, ultrasonido Branson 5510R-MT, balanza Sartorius RC210D, desionizador Milli-Q PLUS de Millipore, columna cromatográfica LiChrospher® 100 RP-18 (5 μ m), 250 - 4.0 mm, MERCK.

Reactivos y materiales: Acetaminofén USP, estándar secundario, Mallinckrodt. Metanol LiChrosolv para HPLC Merck, art. 106018. Etanol 96% USP, Acetona p.a. Merck, agua destilada y desionizada, 4-aminofenol Sigma Chemical Company, gasa hospitalaria Flexon, Lab. BDC Ltda, algodón 100%, tipo VII, USP, no estéril, lámina de acero inoxidable 316L, plantilla de acero de inoxidable 316L, de 10 cm x 10 cm, con área interna para muestreo de 5 cm x 2 cm.

Actividades de prevalidación

El analito a cuantificar se seleccionó con base en criterios de peor caso al evaluar los residuos de fármaco en mayor cantidad en el producto final, el cual corresponde a acetaminofén para el caso particular de la industria en la que se realizó la validación, con una dosis de 500 mg/comprimido. No obstante, la evaluación de la limpieza de las cabinas de pesado se realizó además mediante la evaluación de la materia prima más difícil de limpiar y fármaco más tóxico.

El indicador cuantitativo de la cantidad de residuos se denomina cantidad máxima permisible. La cantidad máxima permisible se determinó con base en el criterio para la determinación visual planteado por Fourman y Mullen, el cual es de 100 μ g/100cm². Existen otros criterios que, en este caso, generan valores mayores para este parámetro, por lo cual se escogió el más crítico a fin de proveer un evaluador más estricto (12-14).

El método de muestreo elegido es el del hisopo, dada la facilidad que ofrece para la toma

de las muestras de manera directa sobre la superficie, los puntos a muestrear quedan expuestos, no son de difícil acceso y se pueden seleccionar los que se consideran críticos. Para muestrear un área total de 100 cm² se emplea una plantilla de 10 cm² de área interna y se muestrean 10 puntos críticos, establecidos anteriormente con base en el mayor riesgo de contaminación. Cada área de 10 cm² se debe muestrear con un hisopo (gasa quirúrgica de aproximadamente 5 cm x 5 cm) impregnado de etanol al 96% y empleando una plantilla de 2 cm x 5 cm. El material de algodón del hisopo elegido, no presenta interferencia con la determinación de acetaminofén. Como solvente para la toma de muestras se eligió etanol al 96%, solvente en el cual el acetaminofén es bastante soluble (3-5, 12).

Con base en la cantidad máxima permisible se realizó el tratamiento de la muestra en el hisopo, de tal forma que de encontrarse esta cantidad en un punto muestreado, 10 µg/10 cm², se obtuviera una solución de acetaminofén cuya concentración pudiera ser cuantificada con exactitud y precisión por la metodología analítica propuesta. El acetaminofén presente en el hisopo se extrae con 5.0 mL de fase móvil para obtener así una concentración máxima teórica de 2.0 µg/mL para la cantidad máxima permisible.

Estandarización de las condiciones cromatográficas

La columna cromatográfica seleccionada es la propuesta en la USP24/NF19 para la cuantificación de acetaminofén cápsulas, L1. La composición de la fase móvil, metanol:agua 20:80, ajustada a pH 3.2 con ácido fosfórico, se estableció luego de analizar varias composiciones, la cual permite obtener una señal adecuada y resultados de idoneidad dentro de especificaciones (15-16).

La longitud de onda se estableció con base en los resultados de los espectros de absorción UV de las siguientes muestras: acetaminofén 2.0 µg/mL, estándar de comparación disuelto en fase móvil; detergente empleado en la limpieza al 2% v/v, 4-aminofenol 25.0 µg/mL disuelto en fase móvil y fase móvil como blanco. La longitud de máxima absorción obtenida para el acetaminofén en el sistema seleccionado es de 244 nm. Las muestras de detergente al 2% v/v y 4-aminofenol presentan una absorción máxima a diferente longitud de onda.

El volumen de inyección estandarizado fue de 20 µL, la velocidad de flujo de 1.0 mL/min y una temperatura en el horno de 25 °C., condiciones con las cuales se obtiene un tiempo de retención de alrededor de 5.9 minutos y una resolución y eficiencia óptimas. El tiempo de corrida definido fue de 10 minutos.

Resultados y discusión

Idoneidad del sistema

En todos los ensayos se analizó un estándar de acetaminofén de 2.0 µg/mL en fase móvil, concentración equivalente a la cantidad máxima permisible con base en el tratamiento del hisopo. Bajo las condiciones establecidas se obtuvo un coeficiente de variación entre las áreas generadas por el estándar menor al 2.0%, un factor de asimetría entre 0.8 y 1.1, un número de platos teóricos mayor a 4000, una resolución entre acetaminofén y 4-aminofenol mayor a 4.0, un factor de separación entre acetaminofén y 4-aminofenol mayor a 1.2 y un factor de capacidad mayor a 2.0 (15-17).

Especificidad

La especificidad se evaluó analizando las siguientes muestras: fase móvil, solvente para la

toma de muestras (etanol 96%), muestra de hisopo (gasa quirúrgica), muestra de hisopo y solvente para la toma de muestras, muestra blanco (área 10 cm² limpia muestreada de acuerdo al procedimiento establecido), acetaminofén 2.0 µg/mL-estándar de comparación, producto de descomposición: 4-aminofenol 25.0 µg/mL, mezcla de acetaminofén 2.0 µg/mL y 4-aminofenol 25.0 µg/mL y detergente empleado en la limpieza al 2% v/v (15-17).

El acetaminofén presenta un tiempo de retención de 5.9 minutos, mientras que las muestras restantes no presentan señal que interfiera con la cuantificación del acetaminofén en el sistema propuesto. La metodología analítica cumple con el parámetro de especificidad para acetaminofén (15-17). En la Figura 1 se presenta el cromatograma obtenido con una solución de acetaminofén en fase móvil.

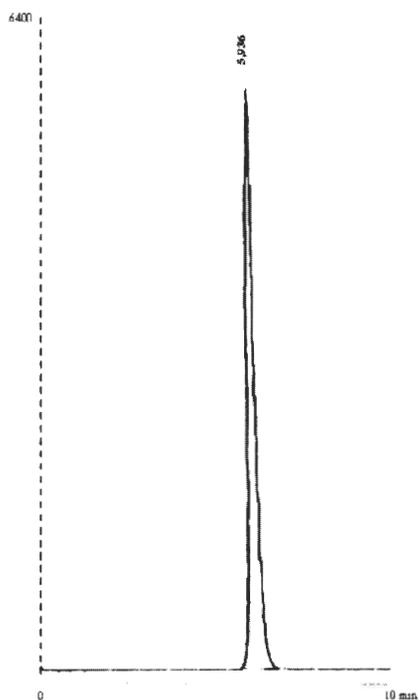


Figura 1. Cromatograma de acetaminofén 2.0 µg/mL

Linealidad del sistema

La linealidad del sistema se analizó evaluando cinco niveles de concentración, en un rango entre 50% y 150% de la solución de comparación para la cantidad máxima permisible y empleando tres réplicas para cada nivel (2, 17). Los resultados se encuentran en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Estimadores de regresión para la linealidad del sistema

Parámetro	Valor	t calculado	Límite de confianza inferior(95%)	Límite de confianza superior(95%)
Correlación r	0.9964	42.6019	-	-
Intercepto a	1718.3	1.0926	-1679.21	5115.88
Pendiente b	31583.07	42.6019	29981.44	33184.69

$$t_{\text{tabulado}} : (13, 0.05) = 2.1604$$

Tabla 2. Análisis de varianza para la linealidad del sistema.

Variables	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fexp	Ftab
Regresión	1	7481175751	7481175751	1740.001	4.96
Linealidad	3	10591229.2	3530409.733	0.8211	3.71
Error puro	10	42995230	4299523		

Ecuación de la recta para la linealidad del sistema: $y = 31583x + 1718.3$

Linealidad del método

La linealidad del método se analizó mediante soluciones obtenidas por la recuperación de acetaminofén sobre superficies que contenían la cantidad de acetaminofén en el rango del

50% y el 150% de la cantidad máxima permisible o límite de aceptación por 10 cm². De esta manera se evaluaron cinco niveles de concentración y tres réplicas de cada una. Los resultados se encuentran en las Tablas 3 y 4.

Ecuación de la recta para la linealidad del método:

$$y = 28700x + 1033.7$$

Tabla 3. Estimadores de regresión para la linealidad del método.

Parámetro	Valor	t calculado	Límite de confianza inferior(95%)	Límite de confianza superior(95%)
Correlación r	0.9617	12.6535	-	-
Intercepto a	1033.7	0.2148	-9361.18	11428.51
Pendiente b	28700	12.6535	23800.16	33600.51

$t_{\text{tabulado}} : (13, 0.05) = 2.1604$

Tabla 4. Análisis de varianza para la linealidad del método.

Variables	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fexp	Ftab
Regresión	1	6177818501	6177818501	178.695055	4.96
Linealidad	3	155883897.2	51961299.06	1.502994499	3.71
Error puro	10	34578491.3	34571849.13		

Con base en los análisis estadísticos tanto para la linealidad del sistema como para la del método se puede concluir: la pendiente es significativamente diferente de cero, indicando que la regresión lineal es significativa, el intercepto no es significativamente diferente de cero y los límites incluyen el cero y la correlación es significativa entre la concentración y la respuesta instrumental. De acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) se puede concluir que la desviación de la linealidad no es significativa y que no existe diferencia significativa dentro de las respuestas para una misma concentración. Hay correlación entre las concentraciones y la respuesta instrumental (áreas), es decir, existe diferencia entre las respuestas para las diferentes concentraciones. Igualmente se concluye que la regresión es significativa (2, 3, 17).

El rango o intervalo lineal dinámico de la presente metodología se establece entre 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, valores de concentración de las muestras entre los cuales se ha demostrado que existe linealidad.

Exactitud

La exactitud se evaluó mediante el porcentaje de recuperación de acetaminofén de la superficie muestreada y del material del hisopo empleado en la toma de muestras, para lo cual se simuló cantidades de acetaminofén sobre superficies de aproximadamente 10 cm^2 , superficies que posteriormente fueron muestreadas y las muestras analizadas de acuerdo a la metodología analítica. La cantidad de acetaminofén recuperado se cuantificó contra un estándar de comparación de 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (2 - 5).

Las cantidades evaluadas corresponden al 50%, 100% y 150% de la cantidad máxima permisible de acetaminofén residual en el proceso

de limpieza, que equivalen a 5.0, 10.0 y 15.0 $\mu\text{g}/10\text{cm}^2$, respectivamente. El porcentaje de recuperación promedio encontrado es 87.49%, con un coeficiente de variación de 6.17%, valor aceptado para metodologías analíticas empleadas en la validación de procesos de limpieza que emplean el muestreo por hisopo, donde se recomienda un porcentaje de recuperación mayor al 70% con un coeficiente de variación menor a 10%.

El porcentaje de recuperación, evaluado mediante un test t de Student es diferente al 100%, por lo que se hace necesario incluir en la fórmula para calcular la cantidad de acetaminofén por área un factor que permita realizar la corrección del valor obtenido al 100% cuando se evalúe la limpieza de las cabinas de pesado de materias primas. El factor calculado corresponde a 1.14.

Precisión

Se evaluó la precisión del sistema y del método mediante repetibilidad y precisión intermedia. La repetibilidad se evaluó en un mismo día, por un mismo analista y con el mismo equipo. La precisión intermedia se evaluó en dos días diferentes y con un analista diferente. La precisión del sistema fue analizada en tres niveles de concentraciones correspondientes al 50, 100 y 150% de la cantidad máxima permisible, con seis repeticiones para cada concentración. Los coeficientes de variación para la precisión del sistema fueron menores al 2%.

La repetibilidad del método contó con un coeficiente de variación de 0.72% y la precisión intermedia con un 3.44%. Para la precisión del método el coeficiente de variación debe ser menor al 10% (2 -5,7, 18).

Límite de detección y límite de cuantificación

La determinación del límite de detección y del límite de cuantificación se realizó mediante los resultados obtenidos para la linealidad y los resultados de una curva de calibración a bajas concentraciones respecto a las utilizadas en el estudio de linealidad, empleando tres niveles de concentración con tres réplicas y las fórmulas:

$$LD = 3.3 \times \sigma / S \text{ y } LC = 10 \times \sigma / S$$

Donde: σ = desviación estándar del intercepto a bajas concentraciones, obtenida con base en los datos de la curva de calibración a bajas concentraciones, S = pendiente de la recta elaborada para la linealidad del sistema.

Los valores de límite de detección y límite de cuantificación se comprobaron experimentalmente, mediante la preparación de soluciones a las concentraciones calculadas teóricamente y con seis determinaciones para cada límite.

Se establece como límite de detección 30.0 ng/mL, equivalente a 0.60 ng; y como límite de cuantificación 80.0 ng/mL, equivalente a 1.60 ng, nivel al cual el acetaminofén es cuantificado con exactitud y precisión (CV = 3.98%) (2, 3).

Robustez

Con base en el modelo factorial de Plackett y Burman (2, 9), se evaluó la robustez de la metodología ante pequeñas variaciones introducidas a propósito en los siguientes parámetros estandarizados: tiempo de inyección de la muestra desde su preparación, temperatura del horno, composición de la fase móvil, pH de la fase móvil, velocidad de flujo, columna y longitud de onda. De acuerdo con los resultados, la única variable de las propuestas como alternativa que afecta significativamente la determinación de

acetaminofén residual es la velocidad de flujo, variable que debe mantenerse bajo control durante el desarrollo y aplicación del método.

Conclusiones

La metodología analítica propuesta cumple con los parámetros de especificidad, exactitud, precisión y linealidad dentro del rango de 1.0 – 3.0 $\mu\text{g/mL}$, es decir, la metodología cumple con los requerimientos oficiales para validación de metodologías analíticas.

El método de muestreo estandarizado y la metodología analítica validada permiten obtener un porcentaje de recuperación de 87.49%, superior al 70%, valor recomendado para metodologías analíticas aplicadas a procesos de limpieza que emplean el muestreo por hisopo.

Con la metodología analítica propuesta se determinan los límites de detección y cuantificación para acetaminofén en 30 ng/mL y 80 ng/mL equivalentes a 0.6 ng y 1.6 ng respectivamente.

Debido al bajo nivel de concentración manejado en la determinación de residuos en procesos de limpieza, la metodología analítica propuesta se afecta por la introducción de pequeños cambios en la velocidad de flujo de la fase móvil por lo que este parámetro debe mantenerse bajo control durante el análisis.

Recomendación

Esta metodología analítica puede ser aplicada a otros equipos empleados en el proceso de fabricación de medicamentos cuyo principio activo sea acetaminofén, considerando que en la evaluación de la especificidad se debe considerar la posible interferencia de un placebo del producto.

Bibliografía

1. Organización Mundial de la Salud, "Buenas Prácticas de Manufactura para la Fabricación de Productos Farmacéuticos", Informe 32, Ginebra, Actualización 1996. Numerales 5 y 15.
2. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Text on Validation of Analytical Procedures. ICH Harmonised Tripartite Guideline. 1996.
3. R.B. Kirsch, Validation of analytical methods used in pharmaceutical cleaning assessment and validation, *Pharm. Technol.*, **22**, 40 (1998).
4. T.M. Rossi y R. R. Ryall, Analytical methods for cleaning procedures", En C. M. Riley y W. Rosanske, "Development and Validation of Analytical Methods", 1ª edición, Editorial Pergamon, Gran Bretaña, 1996, pp. 293-302.
5. S.W. Harder, The validation of cleaning procedures, *Pharm. Technol.*, **8**, 29 (1984).
6. W.K. Gavlinck, L.A. Ohlemeier Y H.J. Kaiser, Analytical strategies for cleaning residue determination, *Pharm. Technol.*, **19**, 136 (1995).
7. K.M. Jenkis y A.J. Vanderwielen, Cleaning validation: an overall perspective, *Pharm. Technol.*, **18**, 60 (1994).
8. A.O. Zeller, Cleaning validation and residue limits a contribution to current discussions, *Pharm. Technol.*, **17**, 70 (1993).
9. J. Agalloco, Points to consider, in the validation of equipment cleaning procedures, *J. Parenteral Sci. & Technol.*, **46**, 163 (1992).
10. FDA, "Guide to Inspection of Validation of Cleaning Processes" (Division of Field Investigations, Office Regional of Regulatory Affairs, Julio de 1993).
11. J.M. Smith, Selecting analytical methods to detect residue from cleaning compounds in validated process systems, *Pharm. Technol.*, **17**, 88 (1993).
12. G.L. Fourman y M.V. Mullen, Determining cleaning validation acceptance limits for pharmaceutical manufacturing operations, *Pharm. Technol.*, **17**, 54 (1993).
13. J.M. Smith, A modified swabbing technique for validation of detergent residues in Clean-in-Place systems, *Pharm. Technol.*, **16**, 60 (1992).
14. D.B. Barr, W.C. Crabbs y D. Cooper, FDA Regulation of bulk pharmaceutical chemical production, *Pharm. Technol.*, **17**, 54 (1993).
15. The United States Pharmacopeia, USP 24, NF 19, The United States Pharmacopoeial Convention Inc. 2000, pp. 17, 1920-1926, 2149-2152.
16. European Pharmacopoeia, Supplement 2001. 3ª edición. Council of Europe. Strasbourg, pp. 28-33.
17. M. Castro, S. Gascón, M. Pujol, J. Sans y L.V. Pla. "Validación de Métodos Analíticos". Monografía A. E. F. I. Sección Catalana, Comisión de Normas de Fabricación y Control de Calidad. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, Cataluña, 1989.
18. W. Horwitz, Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs, and chemistry, *Anal. Chem.*, **54**, 67A (1982).
19. W.J. Youden, The Collaborative Test, *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, **46**, 55 (1963).
20. J.H. Rojas y L.S. de Nigrinis, "Introducción al Análisis Químico Instrumental I", Universidad Nacional de Colombia, 1992.