

# ANÁLISIS DE DISOLVENTES RESIDUALES EN PRODUCTOS FARMACÉUTICOS UTILIZANDO GC-VUV Y HEADSPACE ESTÁTICO

## Introducción a un Nuevo Método para obtener mayor rendimiento de muestra y tiempos de ejecución más cortos en GC

### INTRODUCCIÓN

Los compuestos orgánicos volátiles se utilizan en la fabricación farmacéutica durante la producción de sustancias, aditivos y productos farmacéuticos. Conocidos también como disolventes residuales, suponen el 50-90% de la masa en operaciones farmacéuticas típicas y representan la mayor parte de la toxicidad del proceso.

Estos disolventes orgánicos pueden contaminar el fármaco durante su envasado, almacenamiento y transporte. La comprobación de la presencia de estos disolventes en los Ingredientes Farmacéuticos Activos (APIs) es crítica para la seguridad del paciente y sigue comúnmente el Método guía <467> de Farmacopea en Estados Unidos (USP), o más ampliamente, la directriz Q3C (R6) del Consejo Internacional para la Armonización (ICH).

Los límites de toxicidad analizados por el Método USP <467> están armonizados para ser equivalentes a las recomendaciones de concentración de la Q3C (R6) ICH.

El tiempo de ejecución de la cromatografía de gases (GC) sugerida por el Método USP 467 es de 60 min. Cada clase de solvente es inyectado por separado para asegurar en el análisis la separación completa de los compuestos disolventes. Además, se recomienda identificar y cuantificar los solventes de las Clases 1 y 2 mediante métodos complementarios que utilicen diferentes selecciones de fase estacionaria cuando se compruebe que los disolventes cumplen o superan los límites de concentración de la exposición diaria permitida (PDE).

Se ha desarrollado un método de Cromatografía de Gases – Absorción Ultravioleta de Vacío (GC - VUV) para reducir significativamente el cuello de botella analítico implicado en el ensayo de disolventes residuales en excipientes y productos farmacéuticos. Se ha demostrado que el método GC-VUV da como resultado una reducción de más de 5 veces el tiempo de análisis GC, permitiendo al mismo tiempo la combinación de clases de disolventes residuales en una sola inyección.

Utiliza la capacidad única de la espectroscopía VUV para producir "huellas" espectrales de la mayoría de los compuestos, así como la capacidad de deconvolucionar fácilmente especies coeluyentes a través de algoritmos de software VUV.

Los datos espectrales GC-VUV son intrínsecamente tridimensionales (tiempo, absorbancia, longitud de onda) y específicos para la estructura química del compuesto. La mayoría de los compuestos absorben fuertemente en la región VUV (120 - 240 nm) del espectro UV medido por detección VUV. Los fotones en este rango de longitudes de onda son capaces de producir transiciones electrónicas virtualmente en todos los enlaces químicos, especialmente en transiciones de estado de tierra a estado agitado tales como  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  y  $\pi \rightarrow \pi^*$ .

El resultado son huellas espectrales específicas para cada compuesto y que pueden ser fácilmente identificadas por la librería VUV. Esta característica de la espectroscopía VUV se presta a la compresión intencional cromatográfica gracias a la capacidad de deconvolucionar respuestas espectrales superpuestas.

El método GC-VUV para el análisis de disolventes residuales que se describe a continuación ofrece algunas ventajas clave sobre las condiciones experimentales del Método 467 del USP. En primer lugar, los espectros de absorbancia de VUV proporcionan una identificación autorizada de disolventes al tiempo que proporcionan la cuantificación de compuestos. No se requiere un método separado para verificar la identidad del compuesto o para proporcionar un análisis cuantitativo. En segundo lugar, la compresión cromatográfica es posible sin ninguna pérdida de calidad de los datos.

Se ha demostrado que los tiempos de ejecución de 8 minutos o menos son suficientes para el análisis de disolventes residuales de Clase 1 y 2. En tercer lugar, se pueden analizar diferentes clases de disolventes residuales en un solo análisis. El detector VUV proporciona un amplio rango lineal, límites de detección que se extienden más allá de los límites de concentración de PDE y la capacidad de deconvolucionar la coelución del analito.

## EXPERIMENTAL

### ➤ Instrumentación

El análisis cromatográfico se completó con la siguiente configuración:

**Detector:** VUV Analytics VGA-100

**Muestreador Headspace estático:** GERSTEL MPS2

**Cromatógrafo de gases:** Agilent 6890

**Columna:** Restek 30m x 0.25mm x 1.40µm Rxi-624Sil MS

A continuación, se proporcionan las condiciones experimentales para el cromatógrafo de gases, el muestreador Headspace estático y el detector.

### ➤ Cromatógrafo de gases

Se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent 6890 con su portal de inyección ajustado a 250°C. Se utilizó un caudal de gas portador de helio de 4 ml/min durante todo el experimento. El perfil del horno para el análisis del disolvente residual comenzó a 35°C (se mantuvo durante 1 min), seguido de un aumento a 245°C a una velocidad de 30°C/min. Se utilizó una relación de Split de 2,5 para ayudar a maximizar la sensibilidad. Se programó un tiempo total de ejecución GC de 8 minutos para cada muestra analizada.

### ➤ Muestreador Headspace Estático

Se utilizó un Muestreador Multipropósito GERSTEL (MPS) para proporcionar una automatización óptima de la temperatura y la inyección y la provisión más eficiente de muestras de solvente residual al GC. La temperatura de la jeringa se mantuvo constante a 90°C. Se fijó una temperatura de incubación de 80°C para volatilizar mejor los disolventes residuales sin sobrepasar el punto de ebullición del agua.

El tiempo de incubación se ajustó a 10 min para coincidir con el tiempo de ejecución GC de 8 min. Se seleccionó un volumen de inyección de 250µl para asegurar una buena forma de pico. El agitador fue de 250rpm (10 segundos en on, 1 segundo en off), y se usó una velocidad de inyección de 200µl/seg para la introducción de la muestra.

### ➤ Detector VUV

En este ensayo se utilizó un detector de cromatografía de gases VGA-100 fabricado por VUV Analytics. Las temperaturas de la línea de transferencia y de la celda de flujo se fijaron a 275°C. La presión del gas makeup utilizado fue de aproximadamente 0,36psi. Se seleccionó un rango de adquisición de 120 a 240nm con una velocidad de adquisición de 4,5 espectros/segundo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### ➤ Análisis de Disolventes Residuales de Clase 2

Los experimentos iniciales realizados para demostrar las capacidades cromatográficas de GC-VUV aplicadas al análisis de disolvente residual usaron ácido cítrico como modelo de excipiente. Las muestras se prepararon mezclando 2ml de agua con 100mg de ácido cítrico y dopando Disolvente Clase 2 Mezcla A y B (Restek) para alcanzar los límites de concentración deseados. El tiempo de análisis total GC se fijó en 8 minutos como se describe en la sección Experimental. La Figura 1 muestra el cromatograma GC-VUV de estos disolventes Clase 2. La Tetralina fue el último analito a eluir en el cromatograma y tuvo un tiempo de retención de menos de 7 minutos. Todos los analitos solventes Clase 2 se identificaron en el cromatograma condensado a pesar de la presencia de coeluciones.

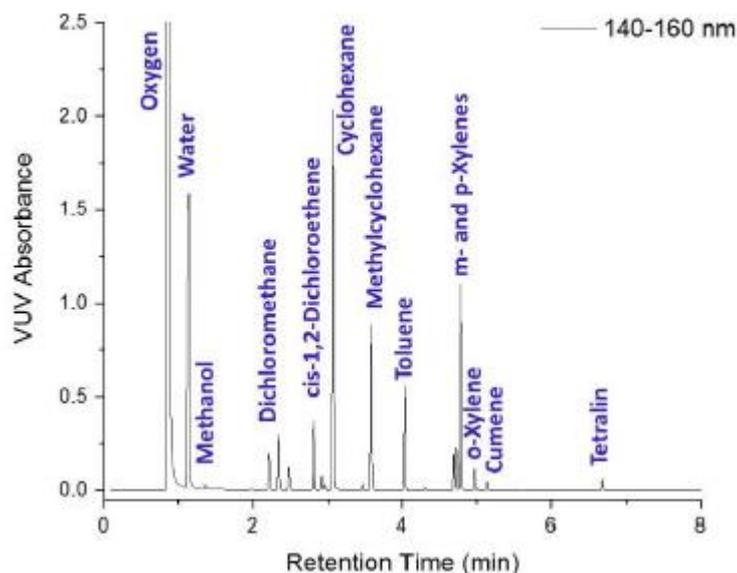
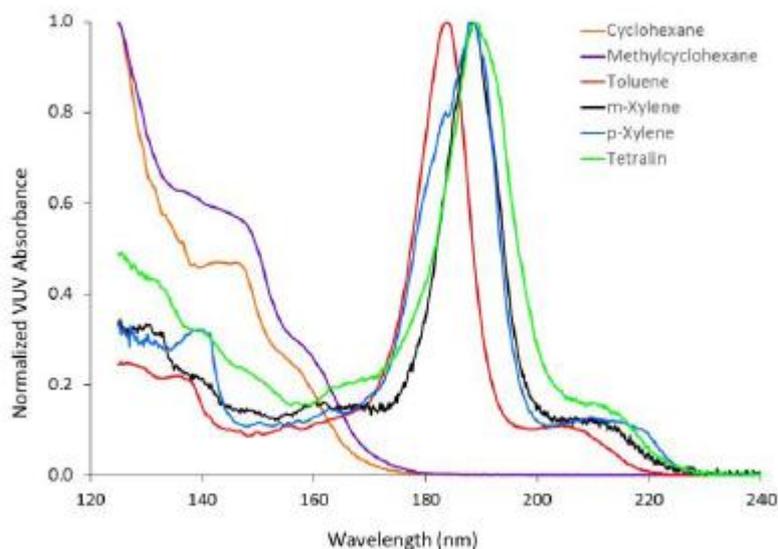


Figura 1: Cromatograma comprimido de gases que muestra los disolventes residuales de Clase 2 separados e identificados en menos de ocho minutos. El tiempo de análisis típico para el método USP 467 es de 60 minutos.

Los disolventes residuales, es así para la mayoría de los compuestos, tienen características espectrales únicas en el rango de longitud de onda VUV. Esta característica se demuestra en la superposición espectral de los disolventes seleccionados de Clase 2 mostrados en la Figura 2. Los isómeros coeluyentes m- y p-xileno tienen espectros distintos que proporcionan una identificación directa y la deconvolución de picos cromatográficos. El software VUVision compara los espectros de analito con los compuestos de la librería VUV. Se proporciona información de calidad de ajuste para asegurar que la identificación correcta del compuesto tenga lugar durante el análisis de los datos.



*Figura 2: Superposición espectral VUV de disolventes residuales de Clase 2. Los espectros son distintos a pesar de las similitudes químicas entre los compuestos y pueden ser reproduciblemente identificados por la librería VUV.*

Una vez demostrado que el método GC-VUV de 8 minutos proporcionaba una separación adecuada de los analitos de disolvente para fines de identificación y cuantificación, el ensayo se repitió para probar la linealidad del detector VUV en concentraciones que oscilaban desde 2X hasta 0,1X su exposición diaria permitida por ICH (PDE) en cuanto a límites de concentración. Todas las pruebas de rangos de concentración de toxicidad se muestran en términos de límites ICH debido a su equivalencia con las directrices USP <467>. La Figura 3 muestra la linealidad cromatográfica de clorobenceno, etilbenceno, m- y p-xileno, y o-xileno. Los cambios predecibles en la respuesta se mantuvieron incluso a bajas concentraciones de ppm.

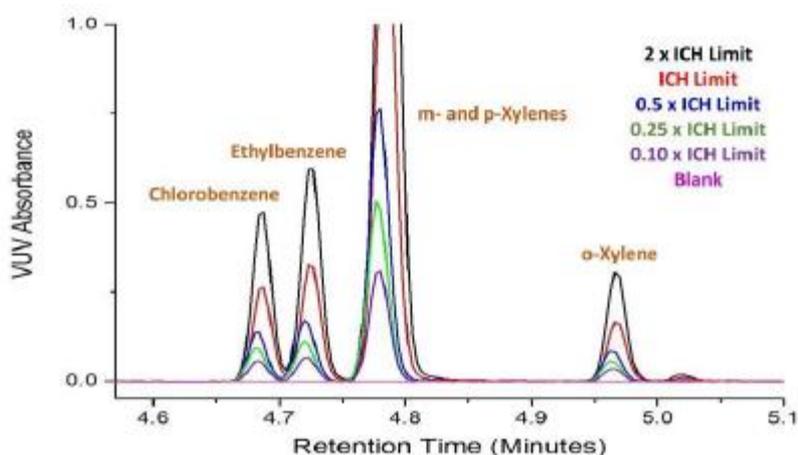


Figura 3: Visión cromatográfica de los disolventes residuales de Clase 2 mostrados en concentraciones que varían desde 2X hasta 0,1X sus límites de concentración de exposición diaria (PDE) permitidos por ICH. La detección VUV demuestra una buena respuesta lineal a través de los rangos mostrados, incluso a bajos límites de detección de ppm.

El mismo comportamiento lineal puede observarse en el cromatograma GC-VUV ampliado de la Figura 4 mostrando el cumeno analizado de 140 a 7 ppm. En la Figura 5 puede observarse una excelente linealidad de 0,9992 R2 en este rango.

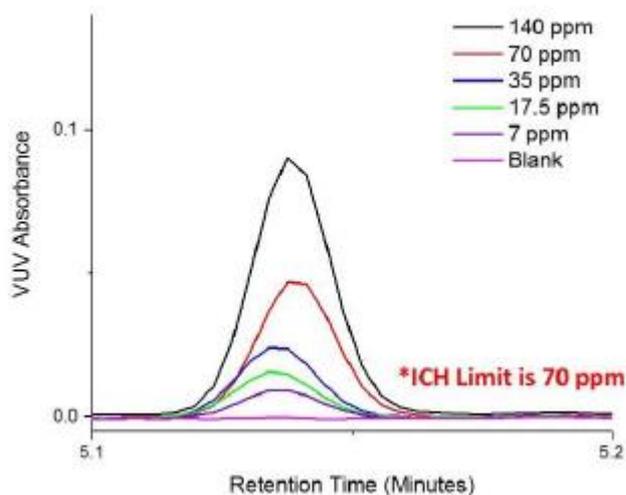


Figura 4: Comparación cromatográfica de cumeno que varía en rangos de 2X hasta 0,1X su límite de concentración ICH.

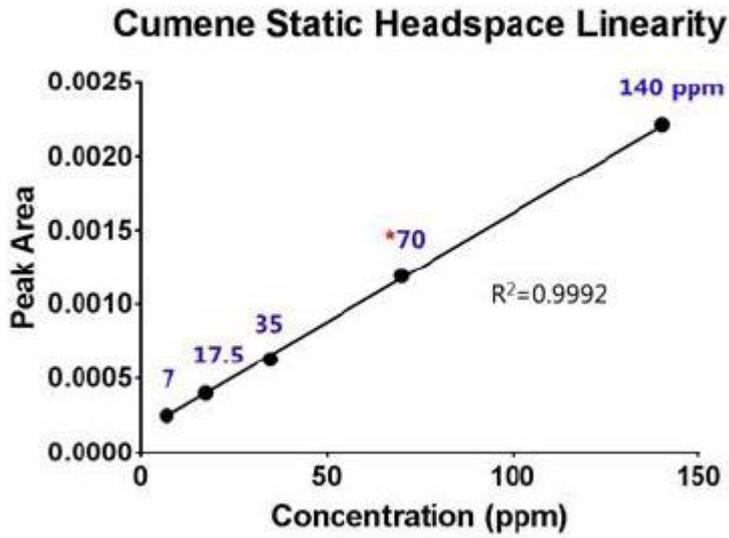


Figura 5: Diagrama de linealidad de cumeno analizado a lo largo de un rango de límites de concentración ICH desde 2X hasta 0,1X.

Se observaron resultados comparables cuando se analizó diclorometano desde 1200 a 60 ppm. La Figura 6 muestra una comparación cromatográfica de concentraciones que varían desde 1200 a 60 ppm y la Figura 7 reporta la linealidad R2 de 0,9969.

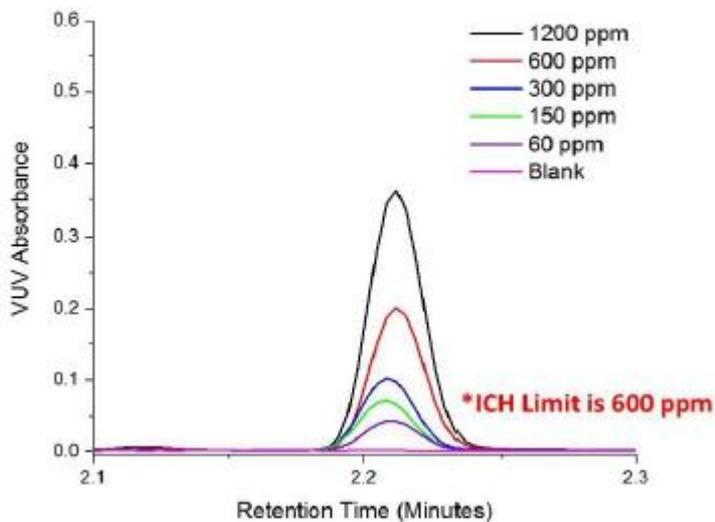


Figura 6: Comparación cromatográfica de diclorometano que varía desde 2X hasta 0,1X su límite de concentración ICH.

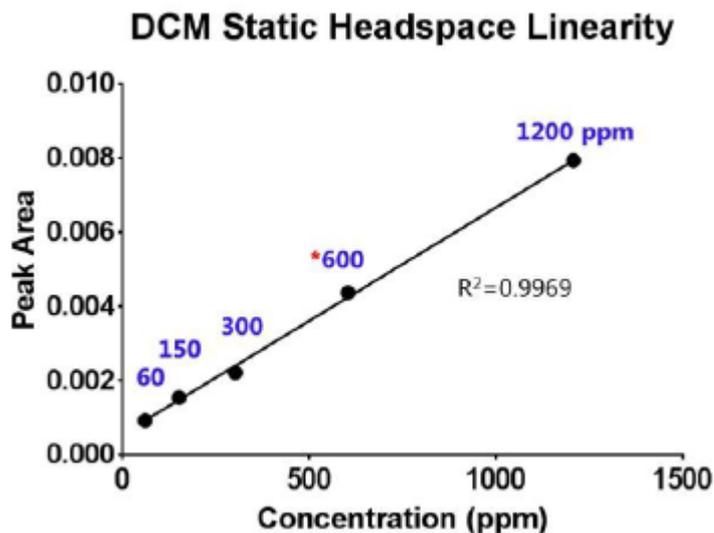


Figura 7: Linealidad cromatográfica de diclorometano a través de un rango límite de concentración ICH desde 2X hasta 0,1X.

➤ **Análisis combinado Clase 1 & 2**

El siguiente paso en la optimización del método GC-VUV para el análisis de disolventes residuales fue caracterizarlos dentro del contexto de una matriz de producto farmacéutico. Se seleccionó un aerosol de garganta genérico de venta libre para el ensayo, y una mezcla estándar de disolventes de Clase 1 y 2 se añadieron en 2mL de solución a concentraciones que van desde 2X hasta 0,1X los límites de ICH objetivo de los analitos.

La Figura 8 muestra una representación cromatográfica de la linealidad del benceno desde 2X hasta 0,1X su límite de concentración de ICH. La gráfica de la Figura 9 demuestra la capacidad del detector VGA-100 para proporcionar una respuesta lineal aceptable ( $R^2 = 0,9938$ ) a intervalos de concentraciones bajas a sub- ppm (4 ppm - 0,2 ppm).

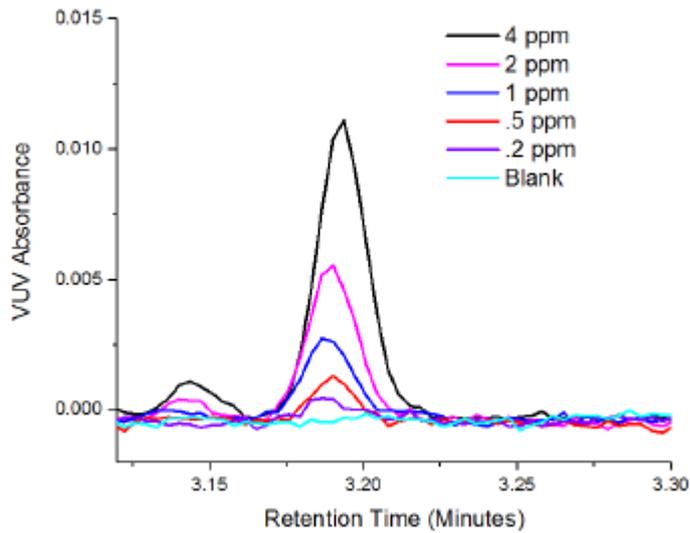


Figura 8: Comparación cromatográfica del benceno mostrada en concentraciones que van desde 2X hasta 0,1X su límite de concentración ICH de 2 ppm.

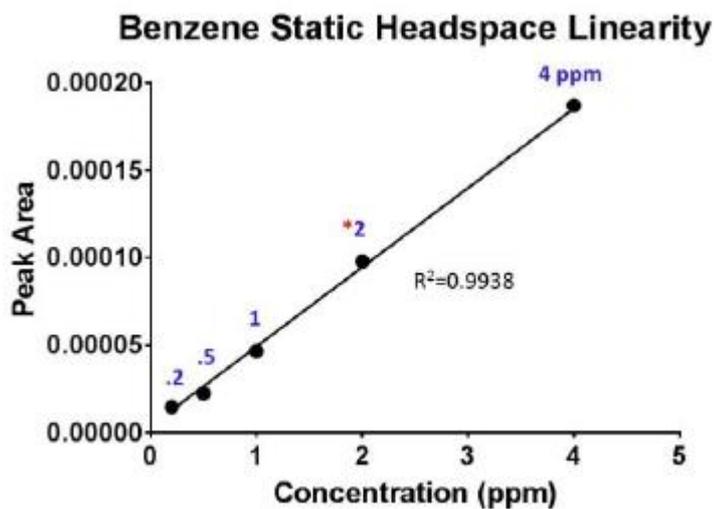


Figura 9: Linealidad cromatográfica del benceno a través de un rango límite de concentración ICH de 2X a 0,1X.

Otro aspecto importante de evaluación de las capacidades GC-VUV en el análisis de disolventes residuales es determinar su reproducibilidad en una matriz de producto farmacéutico. Los patrones de disolventes residuales de Clase 1 y 2 se doparon en el aerosol genérico de garganta a 0,5X el límite de concentración ICH de los analitos objetivo. La Figura 10 muestra una comparación cromatográfica del cumeno de la Clase 2 con cinco inyecciones repetidas. La detección VUV dio como resultado una RSD impresionante de 2,8% a 35ppm. El rendimiento de reproducibilidad permaneció constante incluso en las concentraciones de ppm

más bajas. Se observó una RSD del 6,6% cuando se inyectó benceno disolvente Clase 1 cinco veces a 1ppm, como se muestra en la Figura 11.

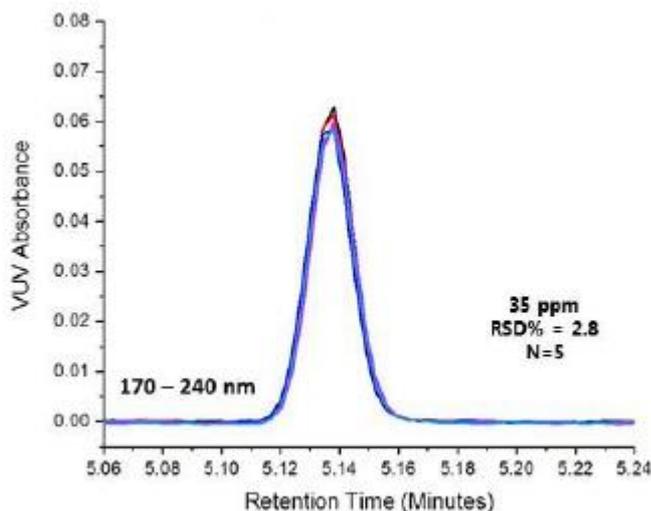


Figura 10: Reproducibilidad cromatográfica de cumeno mostrada a 0,5X su límite de concentración ICH.

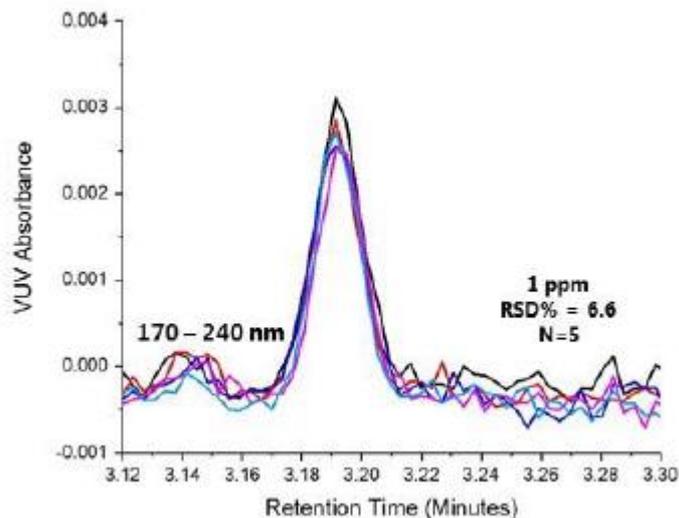


Figura 11: Reproducibilidad cromatográfica de benceno mostrada a 0.5X su límite de concentración ICH.

Como se ha indicado anteriormente, una de las principales ventajas del método GC-VUV para el análisis de disolventes residuales es la capacidad de comprimir la cromatografía y utilizar la deconvolución espectral durante la post-ejecución del análisis. En la figura 12 puede observarse un ejemplo de coelución forzada. En la vista de espectro completo (125 - 240 nm), el benceno aparece como un desnivel de 1,2 - dicloroetano. Se han aplicado filtros espectrales durante el análisis para visualizar la absorbancia relativa de cada compuesto a diferentes rangos de longitud de onda.

Cuando se observan los perfiles espectrales de 1,2-dicloroetano y benceno en la Figura 13, es evidente que ambos compuestos absorben fuertemente en diferentes regiones del espectro de VUV. El 1,2-dicloroetano absorbe más fuertemente entre 125-160 nm, mientras que el benceno tiene su pico de absorción entre 170 y 240 nm.

La aplicación de filtros espectrales puede ser una herramienta de cuantificación eficaz cuando no hay superposición espectral de analitos competidores. En el caso de compuestos coeluyentes como 1,2-dicloroetano y benceno, el medio más eficaz de cuantificar sus concentraciones relativas es aprovechar las ventajas de la deconvolución del software VUVision.

Debido a que los espectros de analitos coeluyentes pueden ser comparados de forma fiable con compuestos en la librería VUV, los algoritmos de software VUV pueden reconstruir sus picos cromatográficos basados en la longitud de onda, absorción y datos de tiempo recogidos durante el análisis GC. La Figura 14 muestra los picos de cromatograma reconstruidos de 1,2-dicloroetano y benceno que reflejan su abundancia relativa en la muestra.

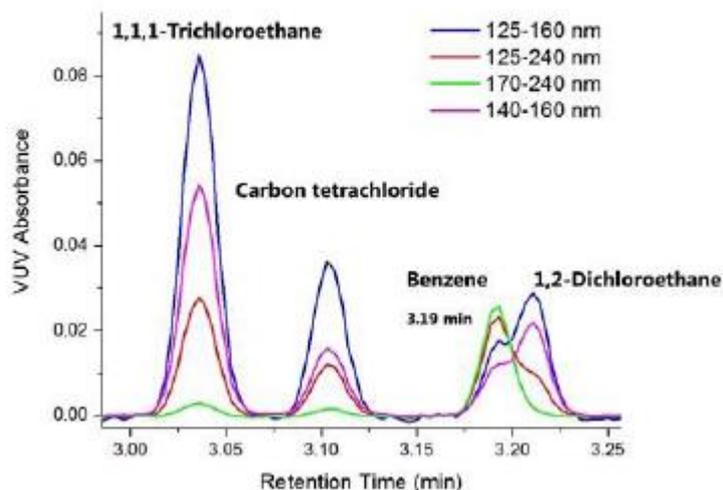


Figura 12: Coelución de 1,2-Dicloroetano y Benceno. Las superposiciones de filtros espectrales muestran cómo los perfiles de pico de los compuestos coeluyentes están influenciados por los rangos de longitudes de onda en los que absorben.

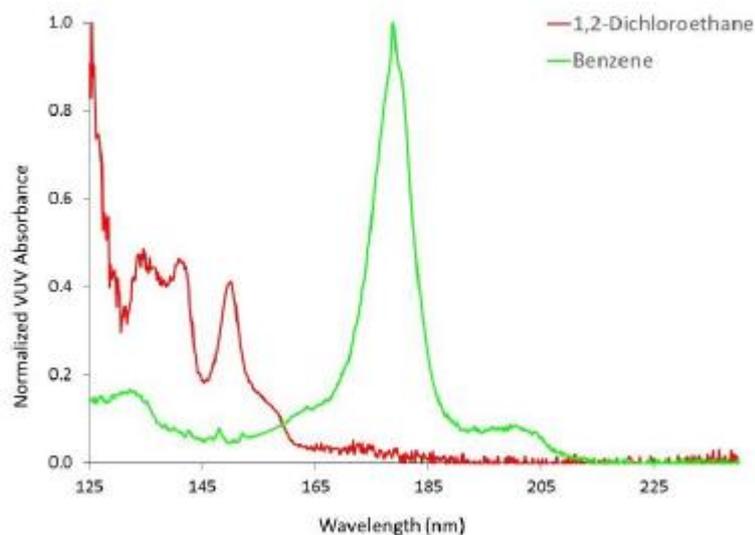


Figura 13: Comparación espectral de 1,2-Dicloroetano y Benceno. Los filtros espectrales se pueden seleccionar basándose en las diferencias espectrales a intervalos de longitudes de onda especificados y aplicarse durante el análisis posterior a la ejecución para facilitar la visualización del compuesto.

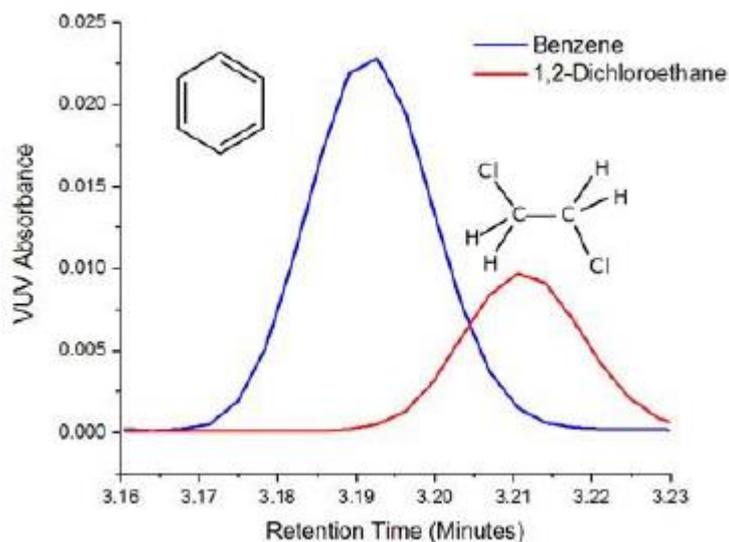


Figura 14: Deconvolución de 1,2-Dicloroetano y Benceno. La coelución se resuelve completamente usando la deconvolución del software VUVision, y las cantidades relativas de cada compuesto se representan en el cromatograma reconstruido

## CONCLUSIÓN

Se ha demostrado que el nuevo método GC-VUV para el análisis de disolventes residuales en productos farmacéuticos reduce significativamente los tiempos de análisis GC y aumenta el rendimiento de muestra en comparación con las condiciones experimentales USP 467. Los tiempos de análisis GC pueden reducirse en 5X o más, y se pueden combinar diferentes clases de disolventes en el mismo proceso para aumentar el rendimiento de la muestra.

La compresión cromatográfica es posible gracias a las huellas espectrales únicas de compuestos en el rango VUV que permiten la deconvolución directa de los analitos coeluyentes. Se demostró que el método GC-VUV proporciona una respuesta lineal, altamente reproducible, en concentraciones que van desde 2X a 0,1X los límites de detección de PDE de Clase 1 y 2.

El análisis de disolventes residuales por GC-VUV proporciona un método único para la identificación y cuantificación de compuestos tóxicos en productos farmacéuticos.

Para obtener información más detallada, visite sitio web en [www.vuvanalytics.com](http://www.vuvanalytics.com), o póngase en contacto con nosotros en [info@gallpe.com](mailto:info@gallpe.com).

## AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos especiales a Jack Cochran, Director de Aplicaciones y a Lindsey Shear-Laude, Científico de Aplicaciones en VUV Analyticals, Inc., por su trabajo en el desarrollo de este método GC-VUV.

**PARA MÁS INFORMACIÓN, POR FAVOR CONTACTE CON NOSTROS**

**GALLPE-AC SOLUCIONES Y SERVICIOS PROFESIONALES, S.L**

**Teléfono: +34 91 849 90 18**

**e mail: [info@gallpe.com](mailto:info@gallpe.com)**

**Soporte: <https://soportegallpe.zendesk.com>**

**web: [www.gallpe.com](http://www.gallpe.com)**

**Redes Sociales**

