



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

PROFESOR PATROCINANTE: Hernán Palma F.
INSTITUTO: Química
FACULTAD: Ciencias

PROFESOR CO-PATROCINANTE: Alejandro Jerez M.
INSTITUTO: Farmacia
FACULTAD: Ciencias

"DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CONCENTRACIÓN DE SOLVENTES RESIDUALES EN FORMAS FARMACÉUTICAS SÓLIDAS Y LÍQUIDAS USANDO MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME) Y CROMATOGRAFÍA DE GAS ACOPLADO A DETECTOR DE MASAS"

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al Título de Químico Farmacéutico.

YESSSENIA ELIZABETH OPAZO CORTÉS

VALDIVIA - CHILE

2008

*Dedicado al esfuerzo de mis padres
Al amor por mi hija
Y al recuerdo de mi abuela*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los docentes de la Universidad Austral que conforman la comisión de este trabajo, los profesores: Hernán Palma por su acogida, ayuda y apoyo; Alejandro Jerez por su dedicación, humildad y consejos; Juan Carlos Paredes por su tiempo y buena disposición.

Agradezco a la Dra. Gladys Avilés y a la Q.F. Paola Jara por su ayuda desinteresada y donación de medicamentos y a todas las personas que colaboraron en la recopilación de muestras para este estudio.

A los académicos del Instituto de Farmacia quienes contribuyeron en mi formación profesional, principalmente a la Q.F. Carin Akesson (Q.E.P.D.) quien con su consecuencia, rectitud y cariño se convirtió en un ejemplo a seguir.

A mis padres, Patricia y Nelson, quienes con su enseñanza basada en el amor han sido el pilar fundamental de mi formación personal y que con su esfuerzo permitieron que adquiriera las bases de mi formación profesional en esta casa de estudio. A mis hermanos, Nelson y Jency, que me acompañaron y apoyaron en esta etapa de mi vida y en especial a mi hija Paula quien fue la mayor motivación para concretar mis metas.

Agradezco a Fabiola Ulloa, Pamela Esprel, Jessica Cárdenas, Susana Gavilán, Cecilia Casas, Yesenia Olavarria y Vania Uribe, con quienes en estos años no sólo he compartido horas de estudio, sino lazos de amistad y vivencias que siempre atesoraré en mi corazón. A Francisco Arias por su incondicional apoyo, amistad, compañía y amor.

A Dios, por ser mi fortaleza interna, y porque cada vez que me equivoqué me guió de su mano al camino correcto, ¡Gracias!

INDICE

	Págs.
RESUMEN	6
SUMMARY	7
1. INTRODUCCIÓN	8-20
1.1 Formulación del marco teórico	8
1.2 Antecedentes bibliográficos	11
1.2.1 Clasificación y límites de los solventes residuales	11
1.3 Planteamiento del problema	17
1.4 Formulación de hipótesis	19
1.5 Objetivos	20
1.5.1 Objetivo general	20
1.5.2 Objetivos específicos	20
2. MATERIAL Y MÉTODO	21-38
2.1 Técnicas seleccionadas	21
2.1.1 Microextracción en Fase Sólida (SPME)	21
2.1.2 Microextracción en Fase Sólida del Espacio en Cabeza de la muestra (HS-SPME)	24
2.1.3 Fibrilla para SPME	25
2.1.4 Tiempo de adsorción con la fibrilla SPME	26
2.1.5 Cromatografía de Gas (GC) en el análisis de solventes residuales	27

	Págs.	
2.2	Lugar de ensayo	28
2.3	Muestras y su origen	29
2.4	Rutina de limpieza del material	29
	2.4.1 Limpieza de la fibrilla	29
	2.4.2 Limpieza de los viales	30
2.5	Método de extracción usado	30
2.6	Identificación de los solventes residuales en las muestras analizadas	32
	2.6.1 Método SOLV-RES	33
2.7	Cuantificación de los solventes residuales encontrados en las muestras analizadas	34
	2.7.1 Confección de curvas de calibración mediante el uso de estándar externo	35
2.8	Determinación de los porcentajes de recuperación de los solventes en estudio	37
2.9	Determinación de los límites de detección y los límites de cuantificación de los solventes encontrados en las muestras analizadas	38

3. RESULTADOS	39-61
3.1 Consideraciones generales	39
3.2 Resultado del análisis cualitativo de las muestras analizadas	40
3.2.1 Solventes clase 2 y clase 3 encontrados en las muestras analizadas	42
3.3 Resultados de la validez del método analítico utilizado	45
3.3.1 Curvas de calibración generadas para los solventes residuales identificados	45
3.3.2 Porcentaje de recuperación de los solventes residuales en estudio	48
3.3.3 Límite de detección y límite de cuantificación de los solventes residuales en estudio	50
3.4 Cuantificación de los solventes residuales identificados en las muestras analizadas	53
4. DISCUSIN	62-75
5. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN DEL TRABAJO	76-78
6. BIBLIOGRAFÍA	79-86
7. ANEXOS	87-91

RESUMEN

El análisis de solventes residuales en productos farmacéuticos ha adquirido gran importancia en las últimas décadas, debido a los esfuerzos realizados para eliminar tales solventes de los productos farmacéuticos terminados por su potencial toxicidad y riesgo a la salud.

El presente estudio corresponde a un análisis de solventes residuales en productos farmacéuticos, utilizando la técnica de Microextracción en Fase Sólida (SPME) y Cromatografía de Gas acoplado a Detector de Masas (GC-MS). Para la extracción de solventes se utilizó la fibrilla de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 μm . Los solventes se identificaron según su tiempo de retención y se cuantificaron usando un estándar externo.

El método fue aplicado a productos farmacéuticos terminados, de formas farmacéuticas sólidas y líquidas, logrando resultados satisfactorios de linealidad, precisión, porcentajes de recuperación, límites de detección y límites de cuantificación en los solventes estudiados, que fueron los incluidos en la clasificación dada por la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH) de técnicas requeridas para el registro de productos farmacéuticos de uso en humanos de 1997, clasificados dentro de tres categorías de acuerdo a su toxicidad.

En las muestras analizadas (100%) se identificaron solventes residuales clase 2, cloroformo (2%) y tolueno (2%), presentes en medicamentos sólidos. Los solventes clase 3 identificados fueron: acetona (3%), 1-butanol (2%), 2-butanol (2%), etanol (37%) y etilacetato (2%), presentes en ambas formas farmacéuticas estudiadas.

Todos los solventes cuantificados se encontraron bajo los límites dados por la ICH, excepto el contenido de etanol, que en 3 medicamentos de presentación sólida y 2 medicamentos de presentación líquida superó el nivel límite establecido por regulación.

SUMMARY

The analysis of residual solvents in pharmaceuticals has gained great importance in recent decades, due the efforts to completely remove such pharmaceuticals solvents since they represent potential risk to human health.

In this study, residual solvents were analyzed by Solid Phase Microextraction technique (SPME) and gas chromatography coupled to mass detector (GC-MS). Solvent extraction polydimethylsiloxane (PDMS) 100 μm fiber was used. Residual solvents were identified according to their retention time and quantified using an external standard.

The method was applied at finished pharmaceutical products, solid and liquid pharmaceutical forms, achieving satisfactory results of linearity, accuracy, recovery, detection limits and quantification limits, studied solvents which were included in the classification given by the International Conference on Harmonization (ICH) in techniques required for pharmaceutical products registration for human use in 1997, classified into three categories according to their toxicity.

Solvents identified in samples (100%) were residual solvents class 2, chloroform (2%) and toluene (2%), in solid medicines. Were identified residual solvents class 3, acetone (3%), 1-butanol (2%), 2-butanol (2%), ethanol (37%) and ethyl acetate (2%), present in solid and liquid pharmaceutical forms studied.

All solvents quantified were under the limits given by ICH, except ethanol which exceeded the limits that those established by regulation in three solid medicines forms and two liquid medicines forms.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del Marco Teórico

Los solventes residuales en productos farmacéuticos se definen como compuestos orgánicos volátiles que son usados y/o producidos durante la síntesis de una sustancia activa de un fármaco; pueden estar presentes en los excipientes usados en la formulación de un medicamento, o pueden ser usados durante la fabricación del producto farmacéutico (ICH Q3C, 1997; Camarasu *et al*, 2006).

Estos solventes orgánicos son usados en la fabricación de productos farmacéuticos por diferentes razones, tales como: solventes para la granulación en la fabricación de comprimidos, como parte del recubrimiento del comprimido, solventes para adhesivos usados en la manufactura de parches transdérmicos, solventes para polímeros usados en la manufactura de implantes, entre otros (CPMP/QWP/450/03 & EMEA/CVMP/511/03, 2005). Podemos encontrar etanol como solvente de purificación/cristalización, ciclohexano usado para denaturar etanol, trietilamina como reactante de síntesis y piridina como un solvente de extracción (Legrand *et al*, 2003). Muchos son usados para mejorar la producción y determinar características tales como la forma del cristal, pureza, o aumentar la solubilidad (Dwivedi, 2002); en el proceso de cristalización los cristales formados pueden atrapar una cantidad finita de solvente como el licor madre, que puede causar degradación del fármaco. En general, los solventes orgánicos juegan un rol esencial en la síntesis de sustancias activas y excipientes (por ejemplo: en reacciones, separación y purificación) y en la formulación de medicamentos (por

ejemplo: en procesos de granulación y recubrimiento de comprimidos) (Camarasu *et al*, 2006).

Aunque los solventes juegan un rol clave en la producción de medicamentos, éstos deben ser eliminados del producto final, ya que muchos de los solventes utilizados tienen propiedades tóxicas o dañan el medioambiente. La eliminación completa de residuos de solventes es poco práctica desde un punto de vista industrial, ya que es inevitable que trazas de solventes queden como remanente en el producto final (Camarasu *et al*, 2006). Sin embargo, los solventes residuales usados en la manufactura de formulaciones farmacéuticas deben ser removidos del producto terminado tanto como sea posible, debido a la toxicidad y los riesgos para la salud, acorde a los estándares regulatorios mundiales, derivados de las consideraciones de seguridad de los pacientes (Pérez *et al*, 2007).

Ya desde el año 1970, se han realizado un gran número de investigaciones para establecer especificaciones y métodos para el control de los solventes residuales en productos farmacéuticos. En 1997, los límites de solventes residuales en relación a su “Exposición Diaria Permitida” (PDE: Permitted Daily Exposure) fueron publicados por la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH) de Técnicas Requeridas para el Registro de Productos Farmacéuticos para el Uso Humano en la Guía Q3C, la cual se hizo efectiva en marzo de 1998. En esta guía la ICH clasificó los solventes en tres categorías dependiendo de los datos de toxicidad existentes para cada uno de ellos. La Administración de Alimentos y Fármacos (FDA: Food and Drug Administration) de los Estados Unidos publicó esta guía en diciembre de 1997 y la Farmacopea Europea (Eur. Ph.) la incluyó en el capítulo “Solventes residuales” (Otero *et al*, 2004; Pérez *et al*, 2007).

A menudo el análisis de solventes residuales se lleva a cabo después del secado de un fármaco a granel o se realiza como un chequeo final en el producto terminado (Camarasu *et al*, 2006); siendo necesario, para apoyar los ensayos de rutina sobre la ausencia de solventes, presentar resultados del contenido de estos (principalmente de los de clase 1 y 2) en 6 lotes consecutivos a escala piloto, o 3 lotes consecutivos a escala industrial de un fármaco (ICH Q3C, 1997).

1.2 Antecedentes bibliográficos

1.2.1 Clasificación y límites de los solventes residuales

Los niveles aceptables para muchos solventes residuales están incluidos en documentos regulatorios, en particular en la Guía Q3C publicada por la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH) de técnicas requeridas para el registro de productos farmacéuticos para el uso humano. Los límites dados en esta guía están basados en estudios de toxicidad (Klick y Sköld, 2004) y en base a ellos, en general, dividen los solventes en tres clases: los solventes clase 1 no pueden ser usados en la manufactura de medicamentos por su toxicidad e impacto medioambiental, los solventes clase 2 son limitados debido a su potencial toxicidad, mientras que los solventes clase 3 se consideran de bajo riesgo para la salud humana (Firor, 2004).

Los solventes clase 1 son conocidos y sospechosos carcinógenos humanos y/o contaminantes ambientales que no pueden ser empleados en la manufactura de principios activos, excipientes, y medicamentos porque su toxicidad y deterioro ambiental es inaceptable. Sin embargo, si su uso es inevitable para producir un medicamento con un avance terapéutico significativo, entonces sus niveles se restringen a los mostrados en la **TABLA 1.2.1a**, a menos que de otro modo sea justificado (ICH Q3C, 1997). La justificación para usar solventes clase 1 como un solvente en el proceso de manufactura industrial de productos farmacéuticos puede estar basado en las técnicas científicas y conocimientos de actualidad y los pasos en los cuales estos solventes están involucrados (por ejemplo, si el uso de un solvente clase 1 es inevitable para una reacción química específica, o si la pureza sólo puede ser obtenida por el uso de un solvente clase 1). Si un solvente de esta clase está involucrado en muchos pasos tempranos del proceso

de manufactura y si la ausencia de este solvente muestra un intermediario adecuado, un método semejante puede ser aceptable (por ejemplo, reacción química de Friedel Crafts). Ciertos solventes clase 1, tales como benceno y 1,2-dicloroetano, pueden ser usados como materiales de inicio en la fabricación de medicamentos. El benceno, como un material de inicio, es comúnmente usado en muchos de los pasos tempranos de la síntesis de una sustancia activa, incluso como clave, antes de que el material de inicio sea obtenido. El uso de benceno como un material de inicio es inevitable cuando el benceno es una parte estructural de la sustancia activa. Esta es la razón por la cual en muchos casos el benceno no se menciona en la descripción del proceso de manufactura. Cuando los solventes clase 1 son usados como materiales de inicio éstos deben ser rutinariamente controlados, ya sea en un intermediario adecuado o en la sustancia activa final. El benceno en una sustancia activa puede ser un subproducto formado desde una reacción química (por ejemplo, reacción de Grignard, donde el haluro de fenilmagnesio usado en exceso es hidrolizado para producir benceno), o puede provenir de otro solvente, por ejemplo, tolueno o acetona donde el benceno se encuentra como impureza. Si un solvente clase 1 pudiera estar presente en otros solventes (como por ejemplo: tolueno o acetona que contienen benceno) no se requiere una prueba de rutina para los solventes de esta clase (clase 1), ya sea a un intermediario adecuado o a la sustancia activa final cuando:

- 1) el límite aplicado para el solvente original es tal que el solvente clase 1 estará presente en la sustancia activa a niveles debajo de los límites permitidos, tomando en cuenta el máximo nivel probable de contaminación de solvente clase 1,
- 2) si se ha demostrado con un método validado que los solventes clase 1 no están presentes en más de un 30% del límite especificado, y
- 3) cuando la especificación para el solvente original usado incluye desarrollar una prueba de

rutina a los límites para los solventes clase 1 (CPMP/QWP/450/03 & EMEA/CVMP/511/03, 2005).

Los límites declarados por la ICH Q3C para solventes clase 1 se muestran en la **TABLA 1.2.1a**, donde además se incluye el solvente 1,1,1-Tricloroetano debido a su condición de contaminante ambiental con una concentración límite de 1500 partes por millón (ppm); todos basados en la revisión de datos de seguridad humana.

TABLA 1.2.1a. Solventes clase 1 en productos farmacéuticos.

Solvente	Concentración límite (ppm)	Riesgo
Benceno	2	Carcinógeno
Tetracloruro de carbono	4	Tóxico y contaminante ambiental
1,2-Dicloroetano	5	Tóxico
1,1-Dicloroetano	8	Tóxico
1,1,1-Tricloroetano	1500	Contaminante ambiental

FUENTE: ICH Q3C (R3), 2005.

Los solventes clase 2 son carcinógenos no genotóxicos en animales y posibles agentes causantes de otras toxicidades irreversibles tales como neurotoxicidad o teratogenicidad y sospechosos de otras toxicidades reversibles pero significantes (ICH Q3C, 1997). Cuando estos solventes son usados antes de los pasos finales en la síntesis de un medicamento pueden quedar exentos de ser examinados a través de controles de rutina sólo si ha sido demostrado, sobre un intermediario o

sustancia activa final, que el contenido de los solventes de esta clase no es más que un 10% de la concentración límite aceptable (por ejemplo: acetonitrilo 41 ppm, que corresponde al 10% de 410 ppm). (CPMP/QWP/450/03 & EMEA/CVMP/511/03, 2005).

Los límites permitidos para solventes clase 2 se presentan a continuación, en la **TABLA 1.2.1b**.

TABLA 1.2.1b Solventes clase 2 en productos farmacéuticos.

Solvente	PDE (mg/día)	Concentración límite (ppm)
Acetonitrilo	4.1	410
Clorobenceno	3.6	360
Cloroformo	0.6	60
Ciclohexano	38.8	3880
1,2-Dicloroetano	18.7	1870
Diclorometano	6.0	600
1,2-Dimetoxietano	1.0	100
N,N-Dimetilacetamida	10.9	1090
N,N-Dimetilformamida	8.8	880
1,4-Dioxano	3.8	380
2-Etoxietanol	1.6	160
Etilenglicol	6.2	620
Formamida	2.2	220
Hexano	2.9	290
Metanol	30.0	3000
2-Metoxietanol	0.5	50

TABLA 1.2.1b (continuación)

Solvente	PDE (mg/día)	Concentración límite (ppm)
Metilbutilcetona	0.5	50
Metilciclohexano	11.8	1180
N-Metilpirrolidona	5.3	530
Nitrometano	0.5	50
Piridina	2.0	200
Sulfolano	1.6	160
Tetralina	1.0	100
Tetrahidrofurano	7.2	720
Tolueno	8.9	890
1,1,2-Tricloroetano	0.8	80
Xileno*	21.7	2170

*Usualmente 60% m-xileno, 14% p-xileno, 9% o-xileno con 17% etilbenceno.

FUENTE: ICH Q3C (R3), 2005.

Los solventes clase 3 son solventes con bajo potencial tóxico para el hombre, por lo que no es necesario límites de exposición, son considerados menos tóxicos y de menor riesgo para la salud humana. A los solventes incluidos en la clase 3 no se les asocia con daños a la salud humana a los niveles normalmente aceptados. Sin embargo, no existen estudios de toxicidad en períodos largos de tiempo o carcinogenicidad para muchos de los solventes de esta clase (CPMP/QWP/450/03 & EMEA/CVMP/511/03, 2005). Datos disponibles indican que los solventes incluidos en la categoría clase 3, según la ICH, mostraron toxicidad menor que

solventes categoría 1 y 2 en estudios de corto plazo y resultados negativos en estudios de genotoxicidad. Se considera que la presencia de cantidades residuales de 50 mg por día o menos (correspondiente a 5000 ppm o 0.5%) de estos solventes en medicamentos podrían ser aceptables junto a una justificación. Cantidades mayores también pueden ser aceptadas si existen fundamentos con datos reales en relación a la capacidad de manufactura y Buenas Prácticas de Manufactura (GMP o Good Manufacturing Practices) (ICH Q3C, 1997).

La lista de solventes clase 3 se muestra en el **CUADRO 1.2.1**.

CUADRO 1.2.1 Solventes clase 3 los cuales podrían ser limitados por GMP u otros requerimientos basados en calidad.

Ácido acético	Etanol	3-Metil-1-butanol
Acetona	Etil acetate	Metiletil cetona
Anisol	Etil éter	Metilisobutil cetona
1-Butanol	Etil formato	2-Metil-1-propanol
2-Butanol	Ácido fórmico	Pentano
Butil acetate	Heptano	1-Pentanol
tert-Butilmetil éter	Isobutil acetato	1-Propanol
Cumeno	Isopropil acetato	2-Propanol
Dimetil sulfóxido	Metil acetato	Propil acetato

FUENTE: ICH Q3C (R3), 2005.

1.3 Planteamiento del problema

Varios de los solventes residuales frecuentemente usados en la producción de fármacos son listados como químicos tóxicos en las monografías del Criterio de Salud Ambiental (EHC) y del Sistema de Información de Riesgo Integrado (IRIS). Los objetivos de grupos tales como el Programa Internacional sobre Seguridad Química (IPCS), la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA), y la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos (USFDA) incluyen la determinación de niveles de exposición aceptable. La meta es la protección de la salud humana y el mantenimiento de la integridad ambiental contra los posibles efectos deletéreos que resultan de la exposición por largo tiempo de compuestos químicos desde el aire del ambiente, comida, agua potable y otros (ICH Q3C, 1997).

Si bien estos solventes orgánicos son usados en el proceso de manufactura de sustancias activas y excipientes, a menudo no son totalmente removidos por las técnicas de síntesis o fabricación practicadas y bajos niveles residuales pueden estar presentes en algunos medicamentos (Klick y Sköld, 2004). El solvente residual no conlleva un beneficio terapéutico, por lo que todo residuo de solvente debe ser removido lo máximo posible acercándose a las especificaciones del producto o a requerimientos basados en la calidad. Los productos farmacéuticos no deben contener niveles altos de solventes residuales que puedan significar un riesgo para la salud (CPMP/QWP/450/03 & EMEA/CVMP/511/03, 2005).

Los niveles designados como seguros, de solventes residuales y otros contaminantes, han tendido a disminuir en los recientes años debido a la información sobre el potencial efecto dañino por largos períodos de exposición y/o bajos niveles de exposición acumulada y a la sensibilidad de detección mejorada de la instrumentación analítica. Por ejemplo, en el año 2003 hubo un cambio en la regulación de los solventes residuales, basado en nuevos datos de toxicidad, que llevó a una reducción de los niveles de Exposición Diaria Permitida (PDE) del solvente N-metilpirrolidona, limitando aún más su contenido residual en medicamentos, de lo permitido en el año 1997. También se reclasificó al tetrahidrofurano que de ser clase 3 entró a la categoría de solventes clase 2 con un PDE y limitaciones de concentración más restrictivas que el tolueno (ICH Q3C (M), 2005).

Para la industria farmacéutica es de gran preocupación detectar y cuantificar solventes residuales en sustancias activas o productos farmacéuticos terminados, debido a que algunos pueden ser altamente tóxicos incluso a niveles traza (Legrand *et al*, 2003). Varios métodos de preparación e inyección de muestras son usados para este fin, como la técnica de inyección directa usando el cromatógrafo de gas convencional, y otros para la cuantificación de solventes en matrices farmacéuticas que incluyen “espacio en cabeza” estático, “trampa y purga”. Sin embargo, estos métodos consumen demasiado tiempo resultando engorrosos y dificultosos. Recientemente la Microextracción en Fase Sólida (SPME) ha ganado popularidad en la determinación de impurezas volátiles orgánicas en compuestos farmacéuticos. SPME es una técnica libre de solventes para la extracción de analitos, donde los tiempos de extracción usualmente varían desde unos pocos minutos a una hora o más y dependiendo de la matriz, analitos, fibra usada y blanco, se puede conseguir la sensibilidad deseada (Raghani, 2002).

Así como los fabricantes de medicamentos deben asegurarse que solventes residuales y contaminantes relacionados no estén presentes en sus productos o lo estén bajo los niveles estipulados como seguros por regulación, y considerando que la salud es una de las necesidades esenciales de la persona humana y su satisfacción plena constituye un mandato social prioritario, -y el centro del ejercicio de la profesión del Químico Farmacéutico-, que en la atención de la salud, tanto preventiva como curativa, los medicamentos juegan un papel insustituible y que es imperativo asegurar la disponibilidad y el acceso a toda la población de los medicamentos indispensables para una terapia efectiva y segura (Decreto-264, MINSAL-CHILE), se hace necesario la realización de un análisis de solventes residuales en productos farmacéuticos terminados, con un método apropiado y conveniente, que permita determinar los niveles de concentración de solventes residuales presentes en los medicamentos y establecer (o acercarse a la realidad) si las medidas de seguridad a la salud humana, en cuanto a los límites de residuos de solventes orgánicos volátiles permitidos en productos farmacéuticos, se cumplen.

1.4 Formulación de hipótesis

“Todos los productos farmacéuticos seleccionados y analizados en este estudio, los cuales son comercializados en Chile, cumplen con las normativas exigidas por entidades reguladoras en relación a los niveles de concentración de solventes residuales”.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

- Determinar los niveles de concentración de solventes residuales en formas farmacéuticas sólidas y líquidas de uso frecuente, expresados como producto terminado, disponibles en el mercado nacional y provenientes de diferentes laboratorios farmacéuticos a fin de identificar el potencial riesgo tóxico que éstos pudieran ocasionar sobre el consumidor.

1.5.2 Objetivos específicos

-Identificar solventes orgánicos residuales en formas farmacéuticas sólidas y líquidas, expresados como producto terminado, mediante la técnica de Microextracción en Fase Sólida (SPME) y Cromatografía de Gas (GC) acoplado a Detector de Masas (MS).

-Determinar los porcentajes de recuperación de solventes residuales desde matrices farmacéuticas sólidas y líquidas, validando el método analítico empleado.

-Cuantificar los solventes residuales encontrados a fin de determinar si cumplen con los límites de seguridad establecidos por entidades reguladoras internacionales.

-Evaluar las consecuencias sobre la salud pública, tomando en cuenta los máximos permisibles por normas internacionales.

2. MATERIAL Y MÉTODO

Previo a la presentación de los materiales y métodos usados en este estudio es necesario exponer las razones que llevaron a la elección de los mismos, éstas se detallan a continuación:

2.1 Técnicas seleccionadas

2.1.1 Microextracción en Fase Sólida (SPME)

La técnica de Microextracción en Fase Sólida (SPME) fue introducida en 1990 por Arthur y Pawliszyn, y fue nombrada así debido a que la primera experiencia usando un aparato SPME involucró la extracción sobre una fibrilla sólida de sílice fundida, y después como referencia a la apariencia de la fase de extracción (Lord y Pawliszyn, 2000a; Ulrich, 2000).

La microextracción se define como una técnica de extracción donde el volumen de la fase extraída es muy pequeño en relación al volumen de la muestra, y la extracción de analitos no es exhaustiva. En muchos casos sólo una pequeña fracción del analito inicial es extraída para análisis. La eficiencia de la extracción está determinada por la partición del analito entre la matriz de la muestra y la fase de extracción. La partición es controlada por las propiedades fisicoquímicas del analito, la matriz de la muestra y la fase de extracción. Cuando la matriz de la muestra y la composición de la fase de extracción son constantes, el grado de partición y por ende el porcentaje de analito extraído debería también ser constante. Una vez ha transcurrido el tiempo suficiente para que se establezca el equilibrio entre la fase de extracción y la muestra, aumentos adicionales del tiempo de extracción no afectan la cantidad de analito extraído.

Cuando el tiempo de extracción no impacta los resultados, la técnica de extracción es simplificada y la precisión mejorada. La técnica de microextracción en fase sólida (SPME), y en particular la fibra SPME, presenta una gran aplicación en la microextracción de fármacos (Lord y Pawliszyn, 2000b).

Aunque SPME fue introducido inicialmente para el análisis de muestras ambientales, hoy la técnica ha sido aplicada a un amplio campo que incluye análisis ambiental y de suelos, agua, alimentos, análisis biológicos, de productos naturales y muestras farmacéuticas, análisis clínico y forense (Koster *et al*, 2000; Mills y Walter, 2000; Ulrich *et al*, 1999). Es una técnica que está en continua consolidación, en los aspectos de fundamentación teórica y de aplicaciones, y dirigida a un amplio rango de analitos en varios tipos de matrices tales como gas, líquido y muestras sólidas (Theodoridis, 2006).

La Microextracción en Fase Sólida fue desarrollada por la necesidad de facilitar la preparación de muestras tanto en el laboratorio como en otros sitios de investigación, haciendo este proceso más rápido; es una alternativa conveniente para la introducción de muestras dentro del cromatógrafo de gas. El aparato SPME se basa en una jeringa modificada, que brinda protección y comodidad de muestreo, con un micro tubo de acero inoxidable que contiene una fibrilla de sílice fundida recubierta con un polímero orgánico o fase polimérica. Los analitos son adsorbidos por esta fase estacionaria directamente desde la muestra por inmersión o “espacio en cabeza”, una vez que se establece el equilibrio entre la muestra y la fibrilla los analitos extraídos por ésta son desorbidos térmicamente dentro de la columna de un cromatógrafo de gas (Camarasu, 2000; Flórez *et al*, 2004; Krogh *et al*, 1997; Page y Lacroix, 1993; Popp *et al*, 1994;

Raghani, 2002). La fibrilla se mueve en dos posiciones, dentro de la aguja o micro tubo, cuando se quiere insertar en la septa del vial de muestreo o del inyector del cromatógrafo y fuera de la aguja, cuando se expone a los analitos para la adsorción y cuando se realiza la desorción térmica en el cromatógrafo de gas. Este procedimiento puede repetirse varias veces con un aparato SPME (Hall y Brodbelt, 1997; Shirey, 1994; Ulrich, 2000). La técnica fue comercializada en 1993 por SUPELCO y el trabajo inicial fue exclusivamente hecho con SPME-GC (Theodoridis *et al*, 2000).

SPME es un método cuyas ventajas lo hacen ideal en la preparación de muestras para análisis de impurezas. Estas ventajas son: libre de solventes, fácil manejo, pequeño equipo requerido, método rápido, fácil automatización, buena linealidad y alta sensibilidad (Eisert y Levsen, 1996; Mills *et al*, 1999; Namera *et al*, 2000; Shirey, 1994; Ulrich, 2000). Las desventajas de la técnica sólo se evidencian en algunas de las áreas de aplicación, como en el análisis biomédico, y más que a la técnica propiamente tal, se deben a características de la matriz y a las volatilidades de los analitos de interés, como la mezcla de baja volatilidad de analitos y una matriz compleja con componentes poliméricos (Lee *et al*, 1998; Ulrich, 2000).

Si la técnica SPME todavía no ha sido aceptada como método de preparación de muestras por farmacopeas, se debería tomar en cuenta su precisión, exactitud y rapidez de análisis, lo cual la hace adecuada para la determinación cualitativa/cuantitativa de solventes residuales en productos farmacéuticos (Camarasu *et al*, 1998).

2.1.2 Microextracción en Fase Sólida del Espacio en Cabeza de la muestra (HS-SPME)

SPME es una simple y versátil técnica de microextracción para compuestos orgánicos volátiles, originalmente desarrollada para microextracción por inmersión desde muestras acuosas. Ha sido también usada para el análisis de compuestos orgánicos volátiles desde el espacio en cabeza (HS o Headspace en inglés) de la muestra de interés (Bartelt, 1997). La microextracción en fase sólida del espacio en cabeza de una muestra fue informada por primera vez en el año 1993 prefiriéndose para compuestos volátiles como: hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), benceno, tolueno, etilbenceno, xileno (BTEX), ya que provee una extracción limpia, de alta selectividad y mayor vida útil de la fibrilla (Aguilar *et al*, 1998; Eisert y Levsen, 1996; Theodoridis *et al*, 2000). La microextracción desde el espacio en cabeza de una muestra se prefiere sobre la inmersión directa de la fibrilla en un líquido ya que se evita, tanto el contacto con polímeros orgánicos que pudiesen degradar la fibrilla reduciendo su vida útil como, la introducción de contaminantes no volátiles (Savary y Nuñez, 2003).

El volumen del espacio que queda sobre una muestra dentro del vial que la contiene (“espacio en cabeza”) es un parámetro importante que afecta la cantidad de analito extraído, dependiendo éste del volumen de la muestra y del volumen del vial contenedor. Al respecto, tanto Camarasu (2000) como Wang y colaboradores (2006) demostraron que la mayor extracción de solventes residuales (tetrahidrofurano, diclorometano, metanol, etanol) desde productos farmacéuticos y mejor precisión de los resultados es obtenida con un espacio en cabeza de 1: 3 (3 mL de espacio en cabeza con respecto a un volumen de 10 mL del vial, ó 5 mL de espacio en cabeza en relación a un vial de 15 mL) (Camarasu, 2000; Wang *et al*, 2006).

2.1.3 Fibrilla para SPME

Varios tipos de recubrimiento para la fibrilla del aparato de microextracción en fase sólida se encuentran comercialmente hoy día. Éstos constan de uno, dos o tres polímeros (por ejemplo: poliacrilato (PA), carbowax-divinilbenceno (CW-DVB), polidimetilsiloxano (PDMS), Carboxen-polidimetilsiloxano (CAR-PDMS), polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS-DVB), carbowax-polidimetilsiloxano-divinilbenceno (CX-PDMS-DVB)) (Legrand *et al*, 2003; Raghani, 2002). Para la selección del recubrimiento o tipo de fibrilla a usarse deben considerarse dos reglas simples:

- 1) La polaridad del recubrimiento de la fibrilla debe ser igual a la polaridad de los analitos, teniendo en cuenta que “similar atrae a similar”. El número de enlaces hidrógeno o grupos como RNH, NH₂ y OH es una propiedad especial del analito, ya que estos grupos, principalmente, determinan la hidrofiliidad de un analito y, de esta forma, también la afinidad por el recubrimiento. Y
- 2) El recubrimiento debe ser resistente a las condiciones extremas, tanto químicas (pH, presencia de sales, aditivos), como físicas (alta temperatura).

Ambos requerimientos se cumplen con el recubrimiento de polidimetilsiloxano (PDMS). El polidimetilsiloxano es el recubrimiento más resistente en SPME, y el rendimiento de la fibrilla es también alta después de repetidas extracciones y desorciones térmicas, por ello debería, sin duda, la fibrilla de PDMS ser la primera en usarse para la aplicación de un nuevo método de microextracción en fase sólida (Aguilar *et al*, 1998; Theodoridis, 2006; Ulrich, 2000).

2.1.4 Tiempo de adsorción con la fibrilla SPME

En búsqueda del tiempo suficiente para establecer el equilibrio entre la muestra y la fase de extracción (fundamento del HS-SPME), Chiarotti y colaboradores determinaron el tiempo necesario para que la extracción de los solventes residuales considerados más representativos en el proceso de recristalización clandestina de cocaína sea máxima, señalando que 32 compuestos orgánicos distintos fueron óptimamente extraídos después de 15 minutos de exposición de la muestra con la fibra PDMS 100 μm . (Chiarotti *et al*, 2002). Usando la misma fibrilla (PDMS, 100 μm), Raghani (2002) encontró que tras 5 minutos de extracción, desde una matriz acuosa, el tolueno mostraba el mayor pico, correspondiente a la máxima cantidad extraída, manteniéndose en el tiempo (hasta los 10 minutos). Para los solventes: tetrahidrofurano, diclorometano, metanol, etanol, se demostró que las áreas de los picos aumentaron con tiempos de extracción mayores, en el rango de 0-15 minutos, y alcanzaron su máximo valor en 15-20 minutos (Wang *et al*, 2006). Por su parte, Camarasu y colaboradores establecieron que el tiempo óptimo de extracción HS-SPME para los solventes residuales (acetonitrilo, diclorometano, cloroformo, 1,2-dicloroetano, benceno, tricloroetileno, piridina y 1,4-dioxano) encontrados en productos farmacéuticos, fue de 30 minutos usando la fibra PDMS 100 μm (Camarasu *et al*, 1998). Liu y colaboradores señalaron que para la extracción óptima de 5 solventes residuales encontrados típicamente en medicina tradicional china (tetracloruro de carbono, etilacetato, etanol, acetonitrilo y acetona) son suficiente 15 minutos de extracción (Liu *et al*, 2003).

2.1.5 Cromatografía de Gas (GC) en el análisis de solventes residuales

La industria farmacéutica puede hoy en día acelerar sustancialmente el desarrollo de nuevos compuestos activos de fármacos en paralelo al desarrollo de técnicas de separación como Cromatografía de Gas (GC). Una de las aplicaciones más importantes de la cromatografía de gas en la industria farmacéutica, es el análisis de solventes residuales en todas las etapas del desarrollo de un medicamento. La aplicación de GC, en controles de calidad y seguridad en los laboratorios farmacéuticos, está principalmente restringida para la determinación de compuestos orgánicos volátiles en la síntesis intermediaria o en la formulación final de sustancias activas, para el análisis de solventes residuales en materiales de inicio en la síntesis de fármacos, formulaciones, productos finales y material de empaque (Sandra *et al*, 2002)

El método más apropiado para el análisis de compuestos orgánicos volátiles es la Cromatografía de Gas (GC), la cual incluye una eficiencia de separación extremadamente alta, y la habilidad de ser acoplada con Espectrometría de Masas (MS) para la identificación de compuestos desconocidos (Fliszar *et al*, 2004). Si bien el análisis de solventes residuales puede ser realizado con varias técnicas analíticas, la principal técnica empleada ha sido y probablemente seguirá siendo la cromatografía de gas, basado en su excelente selectividad y sensibilidad, facilidad de uso y preparación simple de muestras, junto a la capacidad para transferir fácil y cuantitativamente e introducir el solvente residual en la fase gaseosa dentro de la columna cromatográfica para su separación y subsiguiente detección (Camarasu *et al*, 2006).

La Microextracción en Fase Sólida del Espacio en Cabeza de una muestra (HS-SPME) acoplado a Cromatografía de Gas con Detector de Masas (GC-MS) ha demostrado ser una poderosa herramienta en análisis toxicológico, y la preconcentración del analito obtenida con la fibrilla de polidimetilsiloxano (PDMS) ofrece gran ventaja comparado con el HS-GC-MS convencional (Guimbard *et al*, 1987). Así mismo, SPME-GC-MS demostró ser una gran técnica en la identificación y determinación de solventes residuales desconocidos en productos farmacéuticos (Hawthorne y Miller, 1992; Theodoridis *et al*, 2000).

Una vez conocidos los fundamentos que dan origen al esquema de trabajo en este estudio, se detallan, a continuación, los procedimientos, materiales y métodos realizados, con el fin de lograr los objetivos propuestos.

2.2 Lugar de ensayo

Tanto para la extracción de los residuos de solventes orgánicos volátiles desde las respectivas formas farmacéuticas sólidas y líquidas, como para el análisis de identidad y cuantificación de estos solventes se trabajó en el Laboratorio de Química Orgánica Ambiental, ubicado en las dependencias del Instituto de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile, Isla Teja, Valdivia.

2.3 Muestras y su origen

Las muestras sometidas a estudio, con el fin de identificar y cuantificar los residuos de solventes usados en su síntesis o fabricación, correspondieron a medicamentos cuyas formas farmacéuticas se restringieron a sólidos, incluyendo comprimidos, cápsulas, comprimidos recubiertos, y líquidos como jarabes, suspensiones y gotas orales, las que fueron adquiridas principalmente por donaciones y a las que se les identificó el laboratorio productor y/o distribuidor (y su origen), la serie o lote de producción, y su caducidad o fecha de expiración.

Dentro de los medicamentos recolectados se seleccionaron 100 (50 medicamentos sólidos y 50 medicamentos líquidos), priorizando aquellos que son prescritos en tratamiento a enfermedades crónicas, de mayor uso y dirigidos a la población pediátrica.

2.4 Rutina de limpieza del material

2.4.1 Limpieza de la fibrilla

Antes de cada sesión de trabajo el aparato de microextracción (SPME) fue sometido a una corrida cromatográfica donde se expuso 21 minutos desde 60 °C hasta 300 °C de temperatura (programa similar al método de identificación de solventes: SOLV-RES, punto 2.6.1) eliminando con ello por desorción térmica todo compuesto volátil retenido en la fibrilla de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 µm que pudiera interferir o invalidar los resultados obtenidos desde las muestras.

2.4.2 Limpieza de los viales

La microextracción en fase sólida de las muestras en estudio se llevó a cabo en viales de 4 mililitros, a los cuales se les realizó un procedimiento de limpieza previo a su utilización, eliminando posibles interferencias que pudieran afectar la validez de los resultados.

Los viales y sus tapas fueron lavados con pequeñas cantidades de solventes: acetona y diclorometano, ambos solventes MERCK de calidad óptima nano-grado, cuyos residuos se recolectaron y recuperaron para su posterior destilación y reutilización. Luego fueron secados con nitrógeno, en un balón de nitrógeno AGA, para eliminar los restos de solventes y se sometieron 3 horas a 100 °C de temperatura en un horno eléctrico. Las septas de las tapas de los viales también fueron lavadas, secadas y sometidas a 300 °C de temperatura durante 3 horas en un horno, eliminando así, por volatilización, cualquier residuo de solvente o impureza volátil que pudiera interferir en el análisis de las muestras de interés. Una vez limpios los viales con sus respectivas tapas roscas y septas, se taparon y guardaron envueltos en papel aluminio en un frasco limpio.

2.5 Método de extracción usado

Para la microextracción en fase sólida de solventes orgánicos volátiles desde el espacio en cabeza de las muestras en estudio se utilizó el siguiente material:

- Soporte adaptador para fibras SPME (SPME Fiber Holder Manual), SUPELCO.
- Fibra SPME con polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 µm como fase estacionaria, SUPELCO.

- Mortero de porcelana y su respectivo pistilo.
- Viales transparentes con tapa rosca fenólica pre-ensamblados, con septa PTFE-SILICONA de 4 mL. SUPELCO.
- Balanza analítica modelo AND GF-400, ARQUIMED.
- Pipeta volumétrica de 1 mL.
- Soporte metálico, 2 tenazas y 2 nueces FISHER para sostener jeringa y vial.
- Cronómetro NOKIA.

Y el método, para formas farmacéuticas sólidas, consistió en desintegrar el comprimido, ya sea recubierto o no, dentro del blister contenedor mediante un golpe del pistilo en el mortero, una vez disgregado el sólido se vació rápidamente al vial y se tapó. Las cápsulas fueron abiertas y vaciadas directamente dentro del vial. La muestra sólida fue pesada en la balanza analítica, por diferencia del peso total (vial + muestra) en relación al peso del vial. En formas farmacéuticas líquidas se midió con pipeta volumétrica 1 mililitro de jarabe, suspensión o gotas y se vació directamente en los viales.

Una vez contenida la muestra a analizar, sólida o líquida, en el respectivo vial, éste se sostuvo dentro de una tenaza acoplada a un soporte metálico, y la jeringa del aparato SPME, sujeta a otra tenaza superior al mismo soporte, perforó la septa del vial de 4 mL hasta 1.5 centímetro de la graduación de la jeringa y se expuso la fibrilla de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 μm al espacio en cabeza (HS) de la muestra. Tras 20 minutos de adsorción, la fibrilla fue retraída dentro de la jeringa y sacada del vial, luego, rápidamente, se inyectó 4.5 centímetros de la jeringa en el cromatógrafo de gas, y se expuso la fibrilla 3 minutos a desorción térmica.

2.6 Identificación de los solventes residuales en las muestras analizadas

Para la identificación de los solventes orgánicos volátiles desorbidos desde la fibrilla de PDMS 100 μm tras la microextracción en fase sólida realizada a las muestras de interés se necesitó el siguiente material:

- Cromatógrafo de Gas HEWLET-PACKARD 6890 y detector selectivo de masas HEWLET-PACKARD 5973, equipado con un programa HP-MSD Chemstation software con una base de datos de 140.000 compuestos que sirve para identificar automáticamente el solvente encontrado en la muestra según su tiempo de retención y masas.
- Helio grado de alta pureza (99,9999%) AGA, como gas de arrastre para la columna del cromatógrafo.
- Columna cromatográfica capilar HP-5MS 5%-fenil-metilsiloxano de 30 m x 0,25 mm. d.i. y 0,25 μm de espesor de película.
- Computador HEWLET-PACKARD, sistema operativo Windows NT Workstation.
- Impresora HEWLET-PACKARD LaserJet 4050.

Las condiciones operacionales que se programaron en el cromatógrafo de gas fueron las propuestas para el método llamado SOLV-RES, ideado exclusivamente para el análisis de solventes residuales en las muestras escogidas. Éste se detalla a continuación.

2.6.1 Método SOLV-RES.

Las especificaciones correspondientes para el cromatógrafo de gas, fueron:

- Helio grado de alta pureza como gas de arrastre para la columna con una presión de 1,52 psi; a un flujo de 0,5 mL/min. y una velocidad promedio de 26 cm. /seg.
- La temperatura del portal de inyección fue de 250°C; splitless pulseado en la inyección (25,0 psi de presión y un tiempo de pulso de 0,25 min.). Y la programación del horno correspondió a:
- Temperatura inicial del horno de 60°C, mantenida durante 1 minuto.
- Gradiente de temperatura de 15°C/minuto, hasta alcanzar 300°C.
- Luego de alcanzar la temperatura de 300°C, esta se mantuvo por 4 minutos terminando la corrida cromatográfica en un tiempo total de 21 minutos.

Se trabajó el detector de masas en modo TIC (Total Ion Chromatography) para la identificación de los solventes residuales, usando para la ionización de los componentes el modo de impacto electrónico a 70 EV, operando el modo MS Scan a 1,56 scans/segundo, con un full-scans a m/z de 15,0 a 500,0.

A cada muestra analizada se le realizó un blanco, el que consiste en hacer el mismo procedimiento del punto 2.5 y el punto 2.6.1 al vial vacío (sin la muestra sólida o líquida) a modo de pesquisar cualquier contaminante que pudiera quedar en los viales (una vez limpios) y dar un resultado falso. Además, las muestras que resultaron positivas, o sea, que presentaron señal positiva a un determinado solvente, fueron trabajadas por triplicado (se realizó el mismo procedimiento –microextracción en fase sólida y análisis cromatográfico con el método SOLV-RES- 3 veces) confirmando así la veracidad del resultado.

Una vez terminada la corrida cromatográfica del método SOLV-RES se determinó la presencia de los solventes de interés (solventes incluidos en la guía ICH Q3C, 1997) mediante la lista entregada por la librería del programa HP-MSD Chemstation software (integrada en el equipo), donde aparece el nombre de cada compuesto volátil identificado en las respectivas muestras analizadas, su tiempo de retención (RT) y el área porcentual que alcanzan. La presencia del o los solvente(s) en una determinada muestra se confirmó midiendo la abundancia de las masas de 3 iones moleculares característicos, incluido el ión de mayor abundancia, del solvente en el tiempo de retención correspondiente.

2.7 Cuantificación de los solventes residuales encontrados en las muestras analizadas

Para poder cuantificar los residuos de solventes encontrados en las muestras analizadas, y determinar así si cumplen o no con los límites de seguridad establecidos en cuanto a la cantidad permitida de éstos en productos farmacéuticos, se necesitaron los siguientes reactivos y materiales:

- Alcohol etílico 99,5% (Art. 752110; Lote: 411427) Pro-Análisis, Laboratorios CICARELLI.
- 1-butanol Pro-análisis, MERCK.
- Acetona Pro-análisis, MERCK.
- Cloroformo 99,9 % Pro-análisis, MERCK.
- Tolueno Pro-análisis, MERCK.
- Etilacetato Pro-análisis, MERCK.
- 5 matraces volumétricos de 10 mL.

- Pipetas volumétricas de 10 mL.
- Micropipeta (10-100 μ L), PZ HTL S.A., ARQUIMED.
- Jeringa microlitro N°725-N (Pat. N°2933087), HAMILTON.
- Balanza analítica modelo AND GF-400, ARQUIMED.
- Cronómetro NOKIA.
- Lactosa Monohidrato USP, Serie 9558, REUTTER.
- Almidón de maíz, Lote: RS4352, MUNNICH.
- Estearato de Magnesio.
- Jarabe (se utilizó un jarabe obtenido en el comercio que no mostró presencia de solventes residuales en su composición).

Y el procedimiento consistió en medir el área del ión molecular de mayor abundancia (100% de abundancia) para el solvente de interés, en el tiempo de retención correspondiente, obteniendo 3 valores distintos para cada solvente encontrado en una muestra, ya que estas se trabajaron por triplicado; los valores obtenidos fueron incluidos en la ecuación de la línea de regresión calculada mediante la confección de una curva de calibración, realizada como se detalla a continuación.

2.7.1 Confección de curvas de calibración mediante el uso de estándar externo

Para confeccionar las curvas de calibración de los solventes encontrados en medicamentos líquidos se agregó con micropipeta alícuotas de volumen conocido (10 μ L a 100 μ L) del solvente a cuantificar a 5 matraces volumétricos de 10 mililitros que luego fueron completados

hasta el aforo con jarabe (matriz líquida similar a las muestras) y mezclados por agitación, obteniendo 5 concentraciones distintas del solvente. Luego se midió 1 mililitro de volumen de cada solución y rápidamente se vació al respectivo vial de 4 mL., una vez la muestra en el vial, se procedió a realizar la microextracción en fase sólida (ver punto 2.5) y la identificación del solvente (detallado en punto 2.6) obteniendo los respectivos valores de área (cantidad encontrada del solvente).

Los estándares de calibración para los solventes encontrados en medicamentos sólidos se realizaron confeccionando una matriz sólida (similar a la matriz de las muestras sólidas analizadas) midiendo 124 miligramos de almidón, 124 miligramos de lactosa y 2 miligramos de estearato de magnesio en un vial de 4 mL. A la mezcla de polvos de 250 miligramos (en total) se le agregó alícuotas de volumen conocido del solvente a cuantificar con micro jeringa a través de la septa de la tapa del vial y se agitó. Estos estándares de calibración fueron analizados de modo similar a los estándares de calibración de los solventes encontrados en las muestras líquidas.

Para cada solvente en estudio se realizaron 5 estándares de calibración de concentraciones distintas, y el procedimiento se repitió 2 veces (como lo recomienda la Guía ICH Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology) obteniendo 10 estándares de calibración con los que se confeccionó una curva de calibración usando el programa EXCEL OFFICE 2003, midiendo la linealidad del método por el cálculo de una línea de regresión por el método de los cuadrados mínimos, para cada solvente de interés. Además, a cada estándar de calibración previamente se le realizó un blanco de calibración, con 1 mililitro de jarabe en el caso de solventes analizados en matriz líquida y la mezcla de 250 miligramos de polvos para solventes analizados en matriz sólida.

2.8 Determinación de los porcentajes de recuperación de los solventes en estudio

El porcentaje de recuperación o la extracción de cada solvente lograda por la técnica de microextracción en fase sólida del espacio en cabeza (HS-SPME) de una muestra, utilizada en este estudio, se midió a 3 concentraciones distintas de solvente con 3 réplicas cada una, según lo recomienda la Guía ICH Q2B (Validation of Analytical Procedures: Methodology), para lo cual se procedió a limpiar la fibrilla de microextracción y 9 viales, según el punto 2.4.1 y 2.4.2, respectivamente. Cada vial limpio fue completado con la correspondiente matriz (1 mL de jarabe para medir la recuperación de solventes encontrados en muestras líquidas y 250 mg de mezcla de polvos para medir la recuperación de solventes encontrados en muestras sólidas) y tapado. Luego de realizar un blanco a cada vial con la matriz, se agregaron, a través de la septa, con micropipeta alícuotas de concentración conocida del solvente a recuperar, y se mezcló por agitación. A cada vial con la muestra se les realizó microextracción en fase sólida como se detalla en el punto 2.5. Las muestras se inyectaron en el cromatógrafo de gas siguiendo los mismos parámetros expuestos en el punto 2.6.1 (utilizados en la determinación de solventes residuales desde los medicamentos). Una vez terminada la corrida cromatográfica y obtenidas las áreas del solvente extraído (área del ión molecular de mayor abundancia del solvente de interés) éstas fueron incorporadas a la ecuación de linealidad de la curva de regresión del solvente (ver punto 2.7.1) obteniéndose su concentración. Este valor fue comparado con la concentración de la alícuota inicial agregada a la matriz, midiendo el porcentaje de recuperación de cada solvente (promedio de las 9 determinaciones realizadas).

2.9 Determinación de los límites de detección y los límites de cuantificación de los solventes encontrados en las muestras analizadas

Para la determinación del Límite de Detección (DL) y el Límite de Cuantificación (QL) de los solventes residuales que fueron identificados en los medicamentos en estudio, se procedió a medir el área del ión molecular de mayor abundancia en el tiempo de retención correspondiente al solvente de interés a los 10 blancos de los estándares de calibración usados en la confección de la curva de calibración de cada solvente (detallado en punto 2.7.1). Obtenidos los 10 valores del área generada por los blancos de los estándares de calibración de un solvente y la pendiente de la ecuación de la curva de calibración del mismo solvente, se procedió a determinar el límite de detección (1) y el límite de cuantificación (2) según el método basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente propuesto por la ICH Q2B, 1995 (Validation of Analytical Procedures: Methodology), que se muestra en las siguientes expresiones:

$$1) DL = 3.3 \sigma / S$$

$$2) QL = 10 \sigma / S$$

Donde:

σ = Desviación estándar de las áreas de los blancos de los estándares de calibración del solvente analizado.

S = Pendiente de la curva de calibración del solvente analizado.

3. RESULTADOS

3.1 Consideraciones generales

Para efectos de la exposición de los resultados obtenidos en el presente estudio se estructura en el **ANEXO 1** los códigos que representan las respectivas muestras analizadas, las cuales corresponden a medicamentos de formas farmacéuticas líquidas y sólidas.

En base a estos códigos se presentará el análisis cualitativo de las muestras, correspondiente a la búsqueda e identificación de solventes residuales, incluidos en la guía ICH Q3C (ver **TABLA 1.2.1a**, **TABLA 1.2.1b** y **CUADRO 1.2.1**), en la composición de los medicamentos en estudio.

Una vez identificados los solventes de interés, se analizará la validez del método analítico empleado -Microextracción en Fase Sólida (SPME) y Cromatografía de Gas (GC) acoplado a Detector de Masas (MS)-, determinando para cada solvente los parámetros de linealidad, porcentaje de recuperación, límite de detección y límite de cuantificación.

Finalmente, los residuos de los solventes identificados en las muestras analizadas serán cuantificados, mediante una curva de calibración usando un estándar externo, determinando de este modo si los niveles de concentración que éstos presentan en tales muestras se encuentran o no bajo los límites exigidos por las entidades reguladoras pertinentes.

3.2 Resultado del análisis cualitativo de las muestras analizadas

Los resultados cualitativos de las muestras analizadas en el presente estudio se obtuvieron mediante el análisis GC-MS en la modalidad TIC (Total Ion Chromatography) donde, posterior a la Microextracción en Fase Sólida (SPME), se identificaron los solventes residuales de interés.

De los 50 medicamentos líquidos analizados, en 28 de ellos no se detectó la presencia de solventes residuales. Estas muestras fueron: L-01, L-02, L-04, L-05, L-06, L-07, L-10, L-11, L-14, L-16, L-17, L-18, L-19, L-20, L-21, L-23, L-25, L-26, L-27, L-28, L-29, L-34, L-35, L-36, L-38, L-39, L-42 y L-48.

Por su parte, de los 50 medicamentos sólidos analizados no se detectó la presencia de solventes residuales en 30 de ellos. Tales muestras fueron: S-02, S-06, S-08, S-09, S-11, S-12, S-14, S-17, S-18, S-19, S-21, S-22, S-26, S-27, S-29, S-31, S-32, S-33, S-34, S-36, S-37, S-39, S-42, S-43, S-45, S-46, S-47, S-48, S-49 y S-50.

En las muestras restantes, que incluyen 22 medicamentos de presentación líquida y 20 medicamentos de presentación sólida, se identificaron uno o más solventes. Estos solventes corresponden a solventes clase 2 y clase 3, según la clasificación dada por la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH) de 1997.

Los solventes clase 2 encontrados fueron cloroformo y tolueno, y los solventes clase 3 encontrados fueron acetona, 1-butanol, 2-butanol, etanol y etilacetato.

Los resultados cualitativos de las muestras analizadas se resumen en la **TABLA 3.2a** que se detalla a continuación.

TABLA 3.2a Resultado cualitativo de las muestras analizadas por GC-MS.

Código Muestras *	Solventes						
	Clase 2		Clase 3				
	Cloroformo	Tolueno	Acetona	1-Butanol	2-Butanol	Etanol	Etilacetato
L-03						(+)	
L-08						(+)	(+)
L-09						(+)	
L-12				(+)			
L-13						(+)	
L-15						(+)	
L-22			(+)			(+)	
L-24						(+)	
L-30						(+)	
L-31						(+)	
L-32			(+)			(+)	
L-33						(+)	
L-37						(+)	
L-40			(+)				
L-41						(+)	
L-43						(+)	
L-44						(+)	
L-45						(+)	
L-46						(+)	
L-47						(+)	
L-49						(+)	
L-50						(+)	(+)
S-01						(+)	
S-03						(+)	
S-04		(+)				(+)	
S-05		(+)				(+)	
S-07						(+)	
S-10						(+)	
S-13						(+)	
S-15						(+)	
S-16				(+)		(+)	
S-20						(+)	
S-23	(+)					(+)	
S-24						(+)	
S-25					(+)		
S-28					(+)		
S-30						(+)	
S-35						(+)	
S-38						(+)	
S-40							
S-41	(+)					(+)	
S-44						(+)	

(+): En la muestra indicada se identificó el correspondiente solvente residual.

*: Codificación de las muestras analizadas, según se detalla en el anexo 1.

3.2.1 Solventes clase 2 y clase 3 encontrados en las muestras analizadas

Los solventes clase 2, según la clasificación dada por la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH) de 1997, detectados en las muestras analizadas en este estudio fueron los siguientes:

- **Cloroformo:** se identificó en 2 muestras de formas farmacéuticas sólidas, S-23 y S-41, presentando un tiempo de retención (RT), en la corrida cromatográfica de tales muestras, de 0.83 minutos. Y,
- **Tolueno:** se identificó en 2 muestras de presentación sólida, S-04 y S-05, presentando un tiempo de retención (RT), en ambas muestras, de 2.00 minutos.

Para confirmar la presencia de estos solventes en las muestras mencionadas, se midió la abundancia de las masas de los iones moleculares representativos de cada solvente en el tiempo de retención en el cual fueron identificados. Para el solvente cloroformo se seleccionaron los iones de masas 83, 47 y 35 que tienen abundancias de 100%, 35% y 19%, respectivamente. El solvente tolueno fue confirmado por la presencia de los iones moleculares de masas 91, 65 y 39, que tienen abundancias de 100%, 9% y 7%, respectivamente.

Los solventes clase 3 detectados en las muestras estudiadas fueron los siguientes:

- **Acetona:** Se identificó en tres muestras de formas farmacéuticas líquidas: L-22, L-32 y L-40, mostrando un tiempo de retención (RT) de 0.66 minutos. La existencia de acetona en tales muestras se confirmó con la presencia de los principales iones moleculares del solvente, los iones moleculares de masas 43, 58 y 27, que tienen abundancias de 100%, 33% y 8%, respectivamente.

- **1-Butanol:** detectado en las muestras L-12 y S-16. El tiempo de retención (RT) del solvente fue 0.96 minutos y los iones moleculares confirmatorios fueron el ión 56 de abundancia 100%, ión 31 de abundancia 98% y el ión 43 de abundancia 68%.
- **2-Butanol:** se identificó en las muestras sólidas S-25 y S-28, con un tiempo de retención de 0.77 minutos. La presencia del solvente se confirmó con los iones moleculares de masas 45, 31 y 59, los que presentan abundancias de 100%, 22% y 20% respectivamente.
- **Etanol:** fue identificado en un total de 37 muestras, 20 muestras de formas farmacéuticas líquidas y 17 muestras de formas farmacéuticas sólidas. La existencia de etanol en las muestras mencionadas fue confirmada por la presencia de los iones moleculares representativos del solvente. Los iones moleculares seleccionados fueron el ión 31 de abundancia 100%, el ión 45 de abundancia 51% y el ión 15 de abundancia 7%, todos presentes en el mismo tiempo de retención (RT) en que se identificó el solvente etanol, que fue de 0.65 minutos. Y,
- **Etilacetato:** fue detectado en 2 muestras de presentación líquida: L-08, L-50 y 1 muestra de presentación sólida: S-40. El tiempo de retención (RT) de la corrida cromatográfica de las muestras, entregado por la librería del programa HP-MSD Chemstation software, fue 0.81 minutos. La identidad del solvente se confirmó con la presencia del ión 43 de abundancia 100%, el ión 29 de abundancia 21% y el ión 61 de abundancia 12%, en el mismo tiempo de retención.

A modo de ejemplo, se presentan en la **FIGURA 3.2.1a** los cromatogramas de GC-MS (modo TIC: Total Ion Chromatography) de una muestra negativa (L-01) y de una muestra positiva (S-41a), donde se puede apreciar claramente la diferencia entre una muestra que no contiene solventes residuales en su composición, con una que si los contiene. La figura 3.2.1a, se expone a continuación.

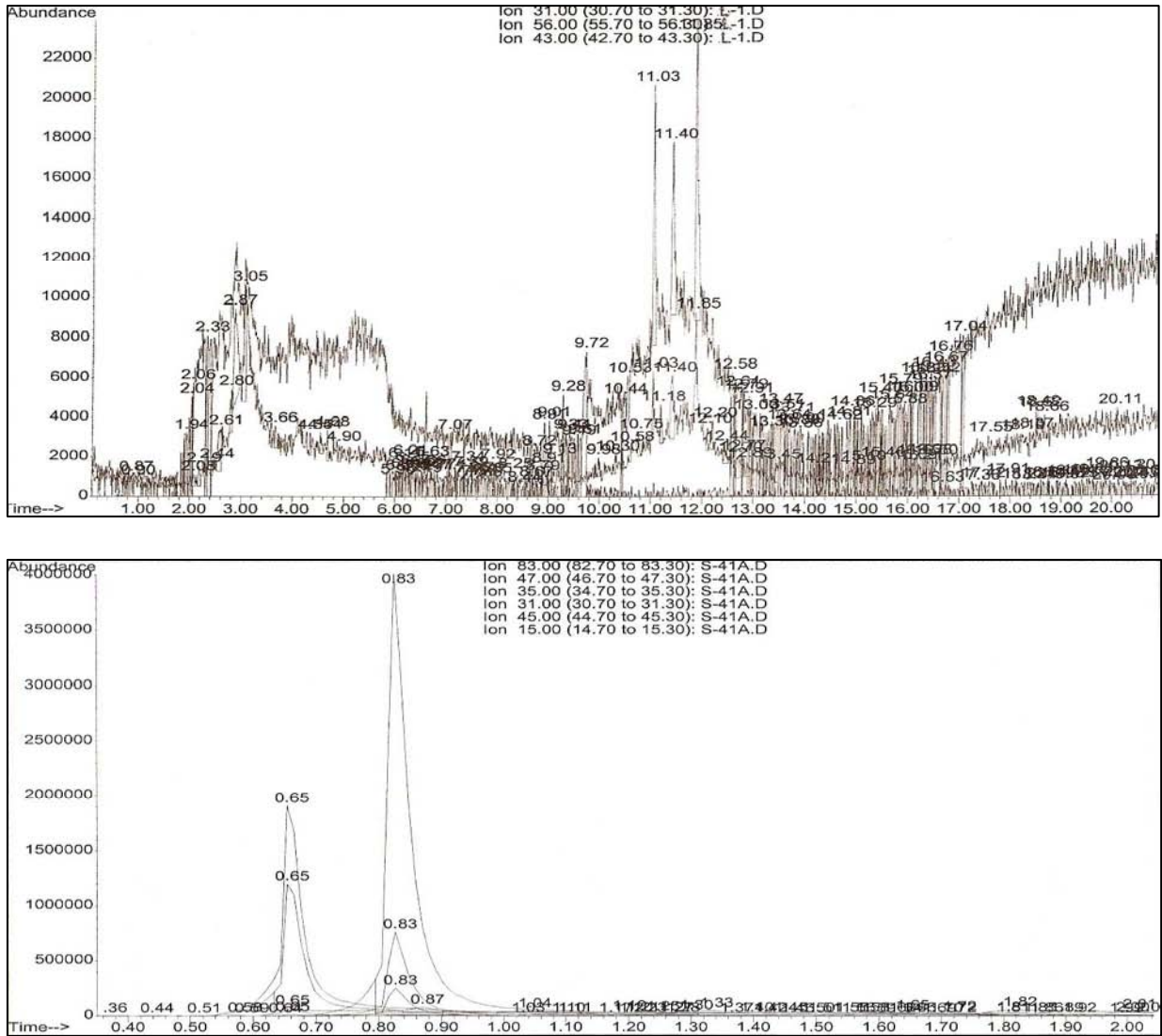


FIGURA 3.2.1a Cromatogramas de GC-MS (modo TIC) de la muestra L-01, en la que no se observan picos característicos representativos de algún solvente residual de interés (figura superior) y de la muestra S-41a, la cual contiene residuos de solventes clase 2 y clase 3. Cloroformo en el RT 0.83 minutos (representado por los iones moleculares 83, 47 y 35) y etanol en el RT 0.65 minutos (representado por los iones moleculares 31, 45 y 15), respectivamente (figura inferior)

3.3 Resultados de la validez del método analítico utilizado

Una vez analizadas las muestras en estudio e identificados los solventes residuales presentes en ellas, se procedió a estimar la validez del método analítico empleado en el presente trabajo.

Los resultados obtenidos se exponen a continuación.

3.3.1 Curvas de calibración generadas para los solventes residuales identificados

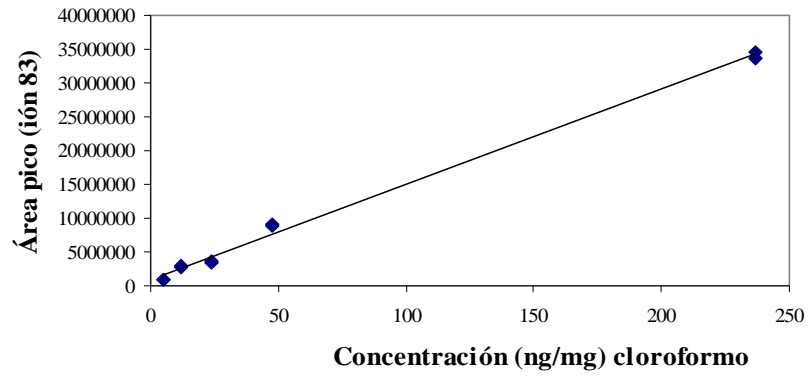
A los solventes detectados en los medicamentos de presentación líquida y sólida analizados, se les confeccionó una curva de calibración mediante el uso de estándar externo, como se detalla en el punto 2.7.1.

Los rangos lineales obtenidos por las curvas de calibración, de los solventes detectados en los medicamentos de formas farmacéuticas sólidas incluidos en este trabajo, fueron de (5-237) ng/mg para cloroformo y de (314-6288) $\mu\text{g/g}$ para etanol, y los coeficientes de determinación (R^2) para ambos solventes fueron 0,9962 y 0,9948 respectivamente. Las curvas de calibración generadas para los solventes mencionados pueden observarse en la **FIGURA 3.3.1a**.

En la **FIGURA 3.3.1b** se observan las curvas de calibración de los solventes encontrados en medicamentos de formas farmacéuticas líquidas, los que presentan rangos lineales que van desde (90-1799) $\mu\text{g/mL}$ para etilacetato, (786-6288) $\mu\text{g/mL}$ para etanol, (790-7900) $\mu\text{g/mL}$ para acetona y (810-8100) $\mu\text{g/mL}$ para 1-butanol. Los coeficientes de determinación (R^2) para dichos solventes fueron de 0,9836 - 0,9970 - 0,9941 y 0,9927 respectivamente.

Las figuras 3.3.1a y 3.3.1b, se muestran a continuación.

A



B

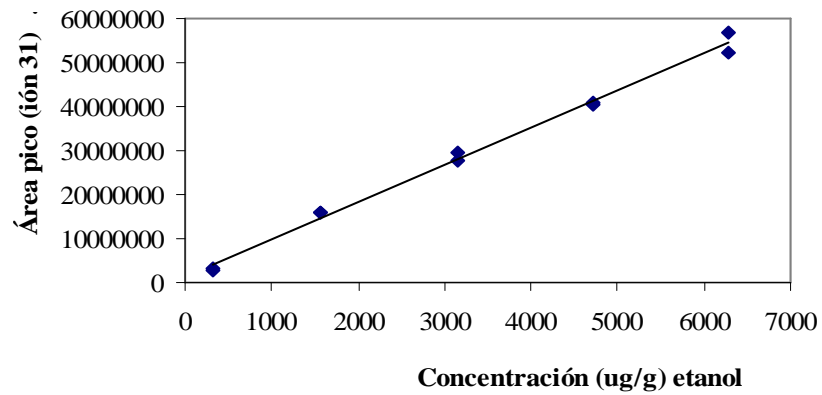
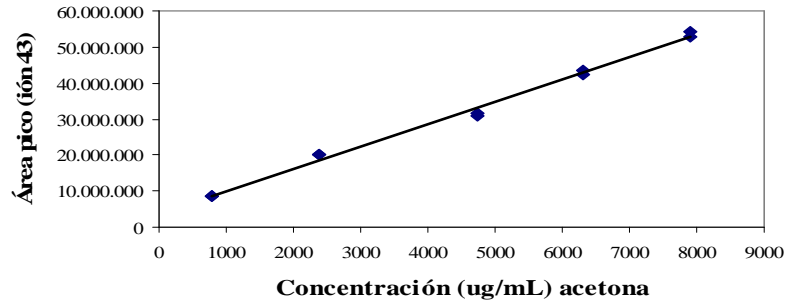
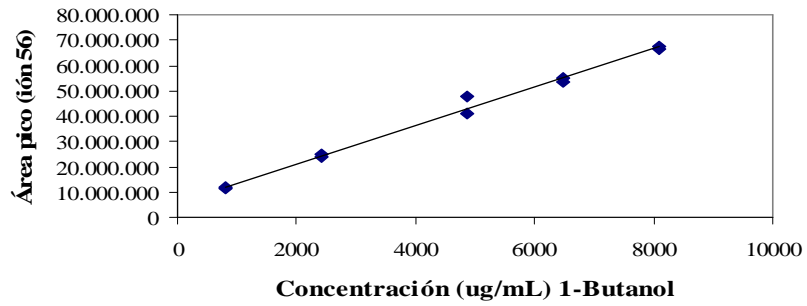


FIGURA 3.3.1a Curvas de calibración de los solventes identificados en los medicamentos de formas farmacéuticas sólidas analizados. A: cloroformo (clase 2), B: etanol (clase 3).

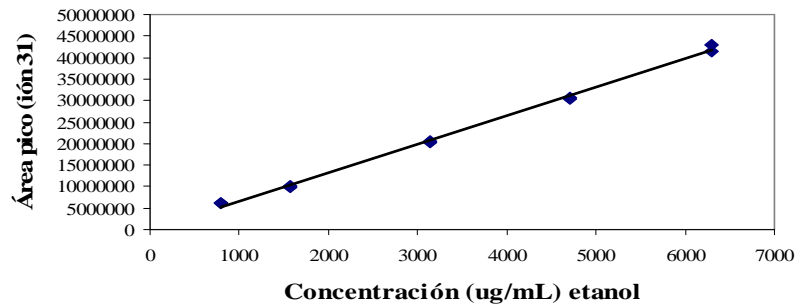
A



B



C



D

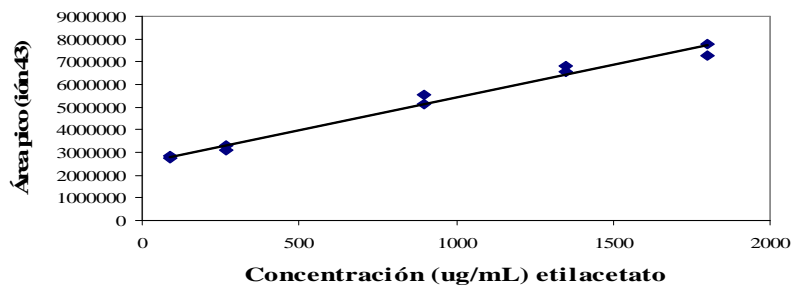


FIGURA 3.3.1b Curvas de calibración de los solventes identificados en los medicamentos de formas farmacéuticas líquidas analizados. A: acetona, B: 1-butanol, C: etanol, D: etilacetato.

3.3.2 Porcentaje de recuperación de los solventes residuales en estudio

El porcentaje de recuperación (R%) obtenido por Microextracción en Fase Sólida (SPME) para cada solvente identificado en los medicamentos analizados, se determinó según se detalla en el punto 2.8.

Los porcentajes de recuperación obtenidos en los solventes identificados en matriz líquida fueron: $90 \pm 4,4$ para el solvente acetona, $96 \pm 5,8$ para 1-butanol, $106 \pm 4,4$ para etanol y $93 \pm 7,4$ para etilacetato; y la desviación estándar residual fue, en todos los casos, menor a 10%. Estos resultados pueden observarse en la **TABLA 3.3.2a**.

Mientras que para los solventes identificados en matriz sólida se obtuvieron valores del porcentaje de recuperación de $93 \pm 3,0$ para cloroformo y $93 \pm 2,2$ para etanol, y desviación estándar residual de 3,2 y 2,4, respectivamente. Tales valores se muestran en la **TABLA 3.3.2b**.

Las tablas 3.3.2a y 3.3.2b, se exponen a continuación.

TABLA 3.3.2a Porcentaje de recuperación de los solventes clase 3 identificados en las formas farmacéuticas líquidas analizadas, a tres concentraciones de solvente (en triplicado).

Acetona		1-Butanol	
Concentración real ($\mu\text{g/mL}$)	R (%)*	Concentración real ($\mu\text{g/mL}$)	R (%)*
1580	87,9	645	99,6
	82,0		85,3
	85,8		93,8
4345	93,0	1620	99,4
	95,2		101,5
	95,4		96,6
6715	90,7	2430	101,2
	87,7		94,1
	89,7		87,6
Promedio \pm S.D.** (n = 9)	90 \pm 4,4	Promedio \pm S.D.** (n = 9)	96 \pm 5,8
R.S.D.*** (n = 9)	4,9	R.S.D.*** (n = 9)	6,1
Etanol		Etilacetato	
Concentración real ($\mu\text{g/mL}$)	R (%)*	Concentración real ($\mu\text{g/mL}$)	R (%)*
1179,1	106,5	179,9	111,1
	110,6		90,4
	109,9		88,1
1965,1	109,8	1079,3	93,1
	109,6		90,7
	104,5		94,5
4323,3	101,6	1349,0	91,0
	99,7		87,7
	100,7		86,5
Promedio \pm S.D.** (n = 9)	106 \pm 4,4	Promedio \pm S.D.** (n = 9)	93 \pm 7,4
R.S.D.*** (n = 9)	4,1	R.S.D.*** (n = 9)	8,0

* Porcentaje recuperado del solvente.

** Desviación estándar.

***Desviación estándar residual.

TABLA 3.3.2b Porcentajes de recuperación de los solventes (clase 2 y clase 3) identificados en las formas farmacéuticas sólidas analizadas, a tres concentraciones de solvente (en triplicado).

Cloroformo		Etanol	
Concentración real (ng/mg)	R (%)*	Concentración real (µg/g)	R (%)*
9,5	91,3	943,3	91,4
	95,2		88,2
	94,1		92,2
16,6	97,7	1572,1	96,1
	93,3		92,8
	91,4		93,0
30,8	89,8	3773,0	92,5
	95,8		93,7
	88,6		94,9
Promedio ± S.D.** (n = 9)	93 ± 3,0	Promedio ± S.D.** (n = 9)	93 ± 2,2
R.S.D.*** (n = 9)	3,2	R.S.D.*** (n = 9)	2,4

* Porcentaje recuperado del solvente.

** Desviación estándar.

***Desviación estándar residual.

3.3.3 Límite de detección y límite de cuantificación de los solventes residuales en estudio

Para determinar los valores del límite de detección (DL) y del límite de cuantificación (QL) de los solventes identificados en las muestras analizadas, con la técnica analítica empleada, se procedió según el punto 2.9. Los valores obtenidos se señalan en la **TABLA 3.3.3a** para los solventes encontrados en las muestras de formas farmacéuticas líquidas y en la **TABLA 3.3.3b** para los solventes identificados en las muestras de formas farmacéuticas sólidas. Ambas tablas se detallan a continuación.

TABLA 3.3.3a Límite de detección y límite de cuantificación usando HS-SPME* del solvente acetona, 1-butanol, etanol y etilacetato, en matriz líquida.

Acetona		1-Butanol	
RT**	Área	RT**	Área
0,679	381.929	0,991	25.286
0,679	325.228	0,980	20.867
0,678	298.548	0,784	22.617
0,654	303.895	0,787	25.973
0,666	282.143	0,999	19.673
0,678	260.615	0,945	20.647
0,679	334.008	1,010	26.936
0,679	257.257	0,990	22.396
0,676	271.619	1,002	24.207
0,687	252.584	1,013	25.475
Promedio	296.782,60	Promedio	23.407,70
S.D. ^A	41.055,37	S.D. ^A	2.519,78
DL^B	21,92 µg/mL	DL^B	1,08 µg/mL
QL^C	66,42 µg/mL	QL^C	3,27 µg/mL

Etanol		Etilacetato	
RT**	Área	RT**	Área
0,656	490.967	0,839	96.276
0,655	511.169	0,818	179.976
0,658	507.698	0,816	116.191
0,632	475.288	0,817	85.409
0,655	484.386	0,784	139.783
0,654	475.864	0,795	118.758
0,657	507.161	0,818	158.867
0,658	494.223	0,830	156.920
0,656	483.831	0,783	92.957
0,657	513.609	0,787	51.502
Promedio	494.419,60	Promedio	119.663,9
S.D. ^A	14.615,49	S.D. ^A	39.524,7
DL^B	7,3 µg/mL	DL^B	45,2 µg/mL
QL^C	22,1 µg/mL	QL^C	137,1 µg/mL

* HS-SPME: Microextracción en Fase Sólida del Espacio en Cabeza de la muestra.

** RT: Tiempo de Retención del solvente en la corrida cromatográfica.

^A S.D.: Desviación Estándar.

^B DL: Límite de Detección.

^C QL: Límite de Cuantificación

TABLA 3.3.3b Límite de detección y límite de cuantificación usando HS-SPME* del solvente cloroformo y etanol, en matriz sólida.

Cloroformo		Etanol	
RT**	Área	RT**	Área
0,830	14.012	0,668	169.054
0,839	15.974	0,666	176.370
0,840	178.884	0,667	188.628
0,837	188.307	0,665	180.588
0,848	21.803	0,665	155.537
0,848	25.059	0,665	177.709
0,837	156.615	0,665	173.395
0,838	124.919	0,675	198.073
0,838	19.280	0,665	151.551
0,848	21.456	0,665	158.865
Promedio	76.631	Promedio	172.977
S.D. ^A	75.466	S.D. ^A	14.699
DL^B	1,8 ng/mg	DL^B	5,7 µg/g
QL^C	5,4 ng/mg	QL^C	17,4 µg/g

* HS-SPME: Microextracción en Fase Sólida del Espacio en Cabeza de la muestra.

** RT: Tiempo de Retención del solvente en la corrida cromatográfica.

^A S.D.: Desviación Estándar.

^B DL: Límite de Detección.

^C QL: Límite de Cuantificación.

3.4 Cuantificación de los solventes residuales identificados en las muestras analizadas

Una vez obtenidos los datos que demuestran la validez del método analítico propuesto para el desarrollo del presente estudio, se procedió a cuantificar los solventes residuales contenidos en las muestras en que se detectaron.

Para este fin, se midió el área generada por el ión molecular de mayor abundancia (100%) a dos muestras similares a la muestra positiva inicial, -en la que se identificó el solvente-, obteniéndose tres valores para cada muestra. Confirmando, de este modo, el resultado entregado y obteniendo además, valores que permiten calcular la desviación estándar residual (R.S.D.) y obtener datos sobre la precisión del método analítico empleado.

Como ya se mencionó en el punto 3.2.1, los solventes clase 2 identificados en las muestras analizadas corresponden a cloroformo y tolueno. Tales muestras al ser trabajadas por triplicado arrojan los valores de área para el ión molecular representativo del solvente (abundancia 100%) mostrados en las tablas 3.4a y 3.4b.

En la **TABLA 3.4a** se observan los valores por triplicado de las áreas generadas por el pico del solvente cloroformo, en las dos muestras en las que fue detectado, el promedio y desviación estándar residual de dichos valores. También se observa el promedio y desviación estándar del tiempo de retención que presentó el solvente en tales muestras.

En la **TABLA 3.4b** se observan los valores por triplicado de las áreas generadas por el pico del solvente tolueno en las dos muestras en las que fue identificado, el promedio y desviación estándar residual de dichas áreas, y el promedio y desviación estándar del tiempo de retención del solvente en tales muestras.

Las tablas 3.4a y 3.4b se exponen a continuación.

TABLA 3.4a Muestras que contienen el solvente cloroformo

Muestra	RT* \pm SD**	Área ^a	Área ^b	Área ^c	Promedio \pm SD**	RSD***
S-23	0,829 \pm 0,002	4.274.555	4.247.767	4.271.057	4.264.460 \pm 14.562	0,34
S-41	0,827 \pm 0,001	10.764.132	10.238.071	10.771.810	10.591.338 \pm 305.962	2,89

^a área de la muestra analizada.

* Tiempo de retención (promedio de las 3 muestras).

^b área del duplicado de la muestra.

** Desviación estándar.

^c área del triplicado de la muestra.

***Desviación estándar residual.

TABLA 3.4b Muestras que contienen el solvente tolueno

Muestra	RT* \pm SD**	Área ^a	Área ^b	Área ^c	Promedio \pm SD**	RSD***
S-04	2,007 \pm 0,004	6.973.108	6.840.703	7.113.096	6.975.636 \pm 136.214	1,95
S-05	2,077 \pm 0,103	14.208.767	15.154.499	14.431.804	14.598.357 \pm 494.375	3,39

^a área de la muestra analizada.

* Tiempo de retención (promedio de las 3 muestras).

^b área del duplicado de la muestra.

** Desviación estándar.

^c área del triplicado de la muestra.

***Desviación estándar residual.

Los valores de las áreas generadas por el ión representativo (100% de abundancia) de los solventes clase 3 identificados en las muestras analizadas se resumen en las tablas que se exponen más adelante. En la **TABLA 3.4c** se observan las muestras que contienen el solvente acetona, la **TABLA 3.4d** detalla las muestras que contienen 1-butanol, en la **TABLA 3.4e** se observan las muestras con residuos de 2-butanol, la **TABLA 3.4f** nos expone las muestras que contienen el solvente etilacetato y la **TABLA 3.4g** nos detalla las muestras en las que se identificó el solvente etanol. Todas las tablas mencionadas se presentan a continuación.

TABLA 3.4c Muestras que contienen el solvente acetona

Muestra	RT* \pm SD**	Área ^a	Área ^b	Área ^c	Promedio \pm SD**	RSD***
L-22	0,654 \pm 0,007	1.785.717	1.736.705	1.789.202	1.770.541 \pm 29.355	1,66
L-32	0,660 \pm 0,004	6.583.794	6.239.258	6.184.376	6.335.809 \pm 216.507	3,42
L-40	0,646 \pm 0,010	33.924.587	33.723.984	33.104.206	33.584.259 \pm 427.666	1,27

^a área de la muestra analizada.

* Tiempo de retención (promedio de las 3 muestras).

^b área del duplicado de la muestra.

** Desviación estándar.

^c área del triplicado de la muestra.

***Desviación estándar residual.

TABLA 3.4d Muestras que contienen el solvente 1-butanol

Muestra	RT* \pm SD**	Área ^a	Área ^b	Área ^c	Promedio \pm SD**	RSD***
L-12	0,954 \pm 0,008	24.164.468	23.183.118	24.523.698	23.957.095 \pm 693.932	2,90
S-16	1,111 \pm 0,005	503.761	697.478	705.508	635.582 \pm 114.231	17,97

^a área de la muestra analizada.

* Tiempo de retención (promedio de las 3 muestras).

^b área del duplicado de la muestra.

** Desviación estándar.

^c área del triplicado de la muestra.

***Desviación estándar residual.

TABLA 3.4e Muestras que contienen el solvente 2-butanol

Muestra	RT* \pm SD**	Área ^a	Área ^b	Área ^c	Promedio \pm SD**	RSD***
S-25	0,775 \pm 0,002	1.544.141	1.539.621	1.595.526	1.559.763 \pm 31.054	1,99
S-28	0,771 \pm 0,012	574.945	628.969	568.482	590.799 \pm 33.214	5,62

^a área de la muestra analizada.

* Tiempo de retención (promedio de las 3 muestras).

^b área del duplicado de la muestra.

** Desviación estándar.

^c área del triplicado de la muestra.

***Desviación estándar residual.

TABLA 3.4f Muestras que contienen el solvente etilacetato

Muestra	RT* \pm SD**	Área ^a	Área ^b	Área ^c	Promedio \pm SD**	RSD***
L-08	0,812 \pm 0,005	3.962.444	4.524.724	4.283.658	4.256.942 \pm 282.090	6,63
L-50	0,896 \pm 0,005	14.213.860	14.482.816	14.674.477	14.457.051 \pm 231.387	1,60
S-40	0,815 \pm 0,016	2.581.574	1.968.121	2.236.981	2.262.225 \pm 307.505	13,59

^a área de la muestra analizada.

* Tiempo de retención (promedio de las 3 muestras).

^b área del duplicado de la muestra.

** Desviación estándar

^c área del triplicado de la muestra.

***Desviación estándar residual.

TABLA 3.4g Muestras que contienen el solvente etanol

Muestra	RT* \pm SD**	Área ^a	Área ^b	Área ^c	Promedio \pm SD**	RSD***
L-03	0,654 \pm 0,007	3.676.009	3.581.940	3.627.062	3.628.337 \pm 47.048	1,30
L-08	0,660 \pm 0,004	13.711.267	14.326.859	13.668.133	13.902.086 \pm 368.496	2,65
L-09	0,646 \pm 0,010	3.455.613	3.453.324	3.221.932	3.376.956 \pm 134.260	3,98
L-13	0,659 \pm 0,005	28.126.075	29.407.600	30.671.883	29.401.853 \pm 1.272.914	4,33
L-15	0,659 \pm 0,005	6.364.618	6.563.680	6.812.399	6.580.232 \pm 224.349	3,41
L-22	0,656 \pm 0,002	2.187.088	2.318.421	2.240.714	2.248.741 \pm 66.033	2,94
L-24	0,651 \pm 0,007	18.233.460	17.962.246	17.115.089	17.770.265 \pm 583.379	3,28
L-30	0,641 \pm 0,004	43.666.655	44.678.693	42.181.032	43.508.793 \pm 1.256.291	2,89
L-31	0,659 \pm 0,007	8.258.590	8.821.768	8.089.181	8.389.846 \pm 383.526	4,57
L-32	0,663 \pm 0,006	7.021.998	6.795.629	6.975.197	6.930.941 \pm 119.498	1,72
L-33	0,649 \pm 0,006	18.570.828	18.540.517	18.336.721	18.482.689 \pm 127.317	0,69
L-37	0,652 \pm 0,005	8.164.764	8.269.066	8.039.209	8.157.680 \pm 115.092	1,41
L-41	0,661 \pm 0,006	31.461.661	32.467.241	31.412.686	31.780.529 \pm 595.213	1,87
L-43	0,653 \pm 0,006	5.311.689	5.378.594	5.168.804	5.286.362 \pm 107.163	2,03
L-44	0,662 \pm 0,006	8.237.956	7.786.762	7.929.742	7.984.820 \pm 230.585	2,89
L-45	0,659 \pm 0,008	15.931.424	16.526.004	16.443.709	16.300.379 \pm 322.163	1,98
L-46	0,660 \pm 0,005	22.448.731	21.472.020	21.063.274	21.661.342 \pm 711.867	3,29
L-47	0,662 \pm 0,007	57.611.592	55.046.327	57.127.861	56.595.260 \pm 1.363.046	2,41
L-49	0,655 \pm 0,001	29.540.063	30.210.878	29.063.175	29.604.705 \pm 576.576	1,95
L-50	0,692 \pm 0,032	8.076.863	8.414.933	8.274.077	8.255.291 \pm 169.816	2,06
S-01	0,656 \pm 0,002	26.139.348	27.777.302	25.071.690	26.329.447 \pm 1.362.787	5,18
S-03	0,703 \pm 0,006	51.675.533	57.377.060	50.949.783	53.334.125 \pm 3.520.039	6,60
S-04	1,337 \pm 0,008	2.063.161	2.259.727	2.139.508	2.154.132 \pm 99.096	4,60
S-05	0,698 \pm 0,010	65.208.135	61.951.313	60.379.376	62.512.941 \pm 2.462.884	3,94
S-07	0,698 \pm 0,001	35.750.763	31.454.544	35.379.327	34.194.878 \pm 2.380.455	6,96
S-10	0,700 \pm 0,002	47.430.875	47.091.328	45.005.876	46.509.360 \pm 1.313.077	2,82
S-13	0,700 \pm 0,011	53.920.447	53.739.311	49.822.785	52.494.181 \pm 2.315.269	4,41
S-15	0,685 \pm 0,027	24.381.973	22.182.932	22.897.001	23.153.969 \pm 1.121.816	4,85
S-16	0,698 \pm 0,002	2.671.637	2.751.738	2.774.088	2.732.488 \pm 53.870	1,97
S-20	0,688 \pm 0,030	17.457.231	17.170.920	18.861.329	17.829.827 \pm 904.705	5,07
S-23	0,657 \pm 0,009	2.318.144	2.519.334	2.742.149	2.526.542 \pm 212.094	8,39
S-24	0,657 \pm 0,009	27.716.725	26.029.099	28.527.400	27.424.408 \pm 1.274.545	4,65
S-30	0,663 \pm 0,006	4.385.646	4.357.765	4.650.572	4.464.661 \pm 161.606	3,62
S-35	0,642 \pm 0,006	35.069.695	33.860.151	34.402.494	34.444.113 \pm 605.845	1,76
S-38	0,657 \pm 0,002	7.039.691	6.753.683	6.618.103	6.803.826 \pm 215.220	3,16
S-41	0,659 \pm 0,006	12.471.090	13.378.743	13.161.198	13.003.677 \pm 473.886	3,64
S-44	0,662 \pm 0,005	9.750.197	9.540.204	9.170.255	9.486.885 \pm 293.625	3,10

^a área de la muestra analizada.

* Tiempo de retención (promedio de las 3 muestras).

^b área del duplicado de la muestra.

** Desviación estándar.

^c área del triplicado de la muestra.

***Desviación estándar residual.

En la muestra sólida S-16 las áreas cuantificadas del solvente 1-butanol fueron muy bajas y la desviación estándar residual (R.S.D.) de las 3 réplicas tuvo un valor mayor a 10%, por lo cual no se incluyó la curva de calibración en el punto 3.3.1 para este solvente en matriz sólida y se propuso *a priori* niveles traza de 1-butanol en la muestra mencionada.

Lo mismo ocurrió con la muestra sólida S-40, en la cual se detectó etilacetato, las áreas por triplicado mostraron valores muy bajos y desviación estándar residual sobre 10%, razón por la cual la curva de calibración no se incluye en los resultados del punto 3.3.1 y se propone niveles traza de etilacetato en la muestra S-40.

El solvente 2-butanol detectado en dos muestras sólidas, S-25 y S-28 (ver tabla 3.4e) se excluyó de la calibración (punto 3.3.1) y las muestras mencionadas no podrán cuantificarse ya que no fue posible conseguir tal solvente para ser incluido en este estudio.

El solvente tolueno detectado en 2 muestras sólidas, S-04 y S-05 (ver tabla 3.4b) no podrá ser cuantificado, ya que aunque se le confeccionó curva de calibración, el tiempo de retención (RT) que presentó el tolueno en las alícuotas de concentración requerida para este estudio fue mayor que el RT que presentó el solvente en las muestras en las que se identificó, razón por la cual no se incluye en los resultados la curva de calibración generada para tolueno (punto 3.3.1), y se proponen niveles de concentración traza del solvente en tales muestras. En la muestra S-04, además, se señala un tiempo de retención (RT) para etanol de 1,337 minutos (en tabla 3.4g), valor que se aleja del RT indicado para el solvente de 0,65 minutos e impide que el etanol presente en S-04 pueda ser cuantificado.

En la **FIGURA 3.4a** se observa el cromatograma de una muestra que contiene el solvente tolueno, y se compara con el cromatograma de un estándar de calibración para el tolueno, pudiendo ser apreciada la diferencia en los tiempos de retención lo cual impide cuantificar los

residuos de este solvente en las dos muestras sólidas donde fue identificado. La figura 3.4a se expone a continuación.

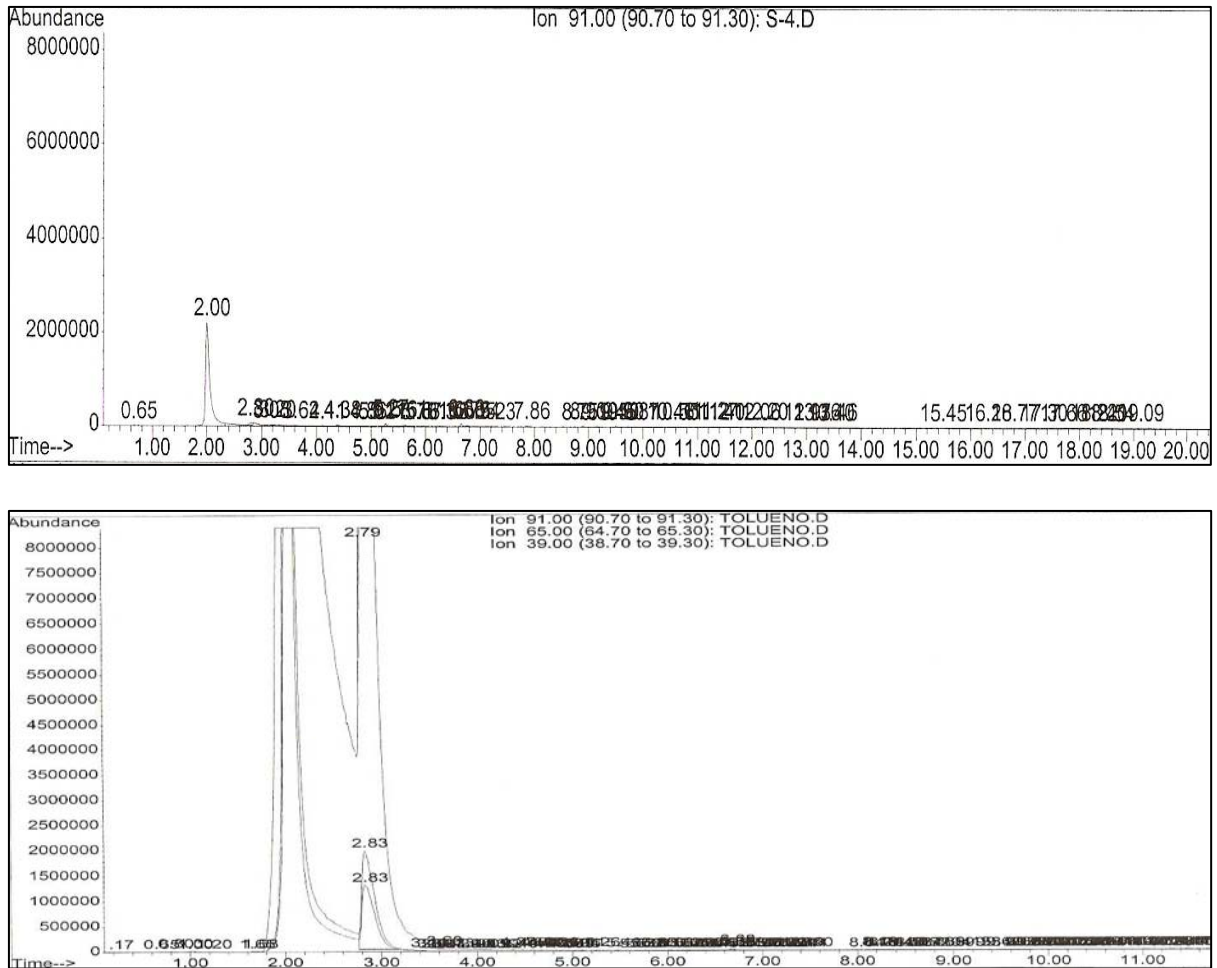


FIGURA 3.4a Cromatogramas de GC-MS (modo TIC) donde se observa la presencia de tolueno (representado por el ión 91 de 100% de abundancia) en la muestra S-04, mostrando su pico característico en el RT 2.00 minutos (figura superior) y el pico para el mismo solvente generado por un estándar de calibración, donde los iones representativos muestran un RT diferente (figura inferior).

Obtenidos los valores de las áreas generadas por el ión molecular de mayor abundancia (100%) de cada solvente identificado en las muestras analizadas, éstos fueron incluidos en la ecuación de regresión lineal del respectivo solvente (detallado en punto 3.3.1), obteniendo así los niveles de concentración de cada solvente residual en la respectiva muestra.

Cabe destacar que en las muestras de presentación sólida el nivel de concentración de un solvente residual se calculó basado en el peso de la matriz sólida del estándar de calibración, el que se uniformó en 250 mg, por lo que fue necesario realizar una corrección del valor original de las áreas expuestas en las tablas 3.4a, 3.4d y 3.4g (valores obtenidos para el peso original de cada muestra sólida), en cambio en las muestras de presentación líquida se trabajó con 1 mL de jarabe, tanto en las muestras propiamente tales, como en los estándares de calibración (descrito en los puntos 2.5 y 2.7.1).

Las tablas que a continuación se presentan resumen los solventes identificados en cada muestra positiva, señalan los niveles de concentración en que estos solventes se presentan en tales muestras (según códigos del anexo 1) y se compara con el límite de ingesta diaria establecido para cada solvente, según la Guía de la Conferencia Internacional sobre Armonización de 1997. En la **TABLA 3.4h** se detalla los niveles de concentración de los solventes cuantificados en las muestras líquidas analizadas y en la **TABLA 3.4i** se presentan los valores de concentración de los solventes cuantificados en las muestras sólidas analizadas.

Las tablas 3.4h y 3.4i se exponen a continuación.

TABLA 3.4h Niveles de concentración de los solventes residuales presentes en los medicamentos de formas farmacéuticas líquidas.

Código Muestra	Solvente Identificado	Cantidad de solvente encontrada (ppm)^(a)	Límite de ingesta diario del solvente (ppm)^(b)
L-03	Etanol	547 ± 7,1	5000
L-08	Etanol	2.101 ± 55,7	5000
	Etilacetato	436 ± 97,8	5000
L-09	Etanol	509 ± 20,3	5000
L-12	1-butanol	2.382 ± 92,1	5000
L-13	Etanol	4.446 ± 192,6	5000
L-15	Etanol	994 ± 33,9	5000
L-22	Etanol	338 ± 9,9	5000
	Acetona	BLD*	5000
L-24	Etanol	2.686 ± 88,3	5000
L-30	Etanol	6.580 ± 190,0	5000
L-31	Etanol	1.267 ± 58,0	5000
L-32	Etanol	1.047 ± 18,1	5000
	Acetona	378 ± 35,0	5000
L-33	Etanol	2.794 ± 19,3	5000
L-37	Etanol	1.232 ± 17,4	5000
L-40	Acetona	4.786 ± 69,2	5000
L-41	Etanol	4.806 ± 90,0	5000
L-43	Etanol	798 ± 16,2	5000
L-44	Etanol	1.206 ± 34,9	5000
L-45	Etanol	2.464 ± 48,7	5000
L-46	Etanol	3.275 ± 107,7	5000
L-47	Etanol	8.559 ± 206,2	5000
L-49	Etanol	4.477 ± 87,2	5000
L-50	Etanol	1.247 ± 25,7	5000
	Etilacetato	3.974 ± 80,3	5000

*BLD: Cantidad bajo el límite de detección posible con la técnica analítica utilizada.

(a): Niveles de concentración determinados en 1 mL de cada muestra líquida.

(b): Límites establecidos según la ICH Q3C, 1997.

TABLA 3.4i Niveles de concentración de los solventes residuales presentes en los medicamentos de formas farmacéuticas sólidas.

Código Muestra	Solvente Identificado	Cantidad de solvente encontrada (ppm)^(a)	Límite de ingesta diario del solvente (ppm)^(b)
S-01	Etanol	7.555 ± 405,9	5000
S-03	Etanol	13.111 ± 698,8	5000
S-04	Etanol Tolueno	NC* Trazas ^(c)	5000 890
S-05	Etanol Tolueno	8.005 ± 410,8 Trazas ^(c)	5000 890
S-07	Etanol	3.583 ± 128,1	5000
S-10	Etanol	4.273 ± 217,7	5000
S-13	Etanol	3.721 ± 132,4	5000
S-15	Etanol	2.048 ± 117,8	5000
S-16	Etanol 1-Butanol	85 ± 7,8 Trazas ^(c)	5000 5000
S-20	Etanol	1.227 ± 56,3	5000
S-23	Etanol Cloroformo	133 ± 12,9 18 ± 0,8	5000 60
S-24	Etanol	1.173 ± 46,6	5000
S-25	2-Butanol	S/I ^(d)	5000
S-28	2-Butanol	S/I ^(d)	5000
S-30	Etanol	854 ± 17,5	5000
S-35	Etanol	9.633 ± 144,1	5000
S-38	Etanol	1.604 ± 20,5	5000
S-40	Etilacetato	Trazas ^(c)	5000
S-41	Etanol Cloroformo	254 ± 0,2 29 ± 1,4	5000 60
S-44	Etanol	809 ± 22,5	5000

* No cuantificable (indicado en punto 3.4).

(a): Niveles de concentración determinados en 250 mg de cada muestra sólida.

(b): Límites establecidos según la ICH Q3C, 1997.

(c): Niveles trazas según comentario realizado en el punto 3.4

(d): Sin información (ver punto 3.4).

4. DISCUSIÓN

Existe un gran número de investigaciones que buscan establecer métodos efectivos para el control de solventes residuales en medicamentos, lamentablemente, también existe un gran número de publicaciones que señalan la existencia de estos solventes en medicamentos dirigidos a la población humana, tanto en formas farmacéuticas líquidas como en formas farmacéuticas sólidas.

Identificación de solventes residuales en formas farmacéuticas sólidas y líquidas.

Recientemente Pérez y colaboradores (2006) determinaron la presencia de solventes residuales en 27 productos farmacéuticos diferentes, 21 medicamentos de presentación sólida y 6 medicamentos de presentación líquida. Tales autores encontraron que sólo en 7 medicamentos analizados no se identificó algún solvente residual incluido en la guía ICH Q3C, mientras que en los 20 medicamentos restantes identificaron uno o más solventes. De las 14 formas farmacéuticas sólidas en las que detectaron solventes residuales, sólo en una identificaron la presencia de 1 solvente (2-propanol), en 5 medicamentos de presentación sólida identificaron la presencia de 2 solventes (entre ellos tolueno y 1-butanol), mientras que en los restantes identificaron 3 o más solventes (entre ellos tolueno, acetona, 1-butanol, etanol, y etilacetato). De las 6 formas farmacéuticas líquidas en las que detectaron la presencia de solventes residuales, en 3 identificaron sólo 1 solvente (en 2 etanol y en 1 acetona), mientras que en los otros 3 medicamentos de presentación líquida identificaron la presencia simultánea de 3 solventes residuales (etanol, etilacetato y 1-butanol) (Pérez *et al*, 2006).

Teniendo como antecedente la experiencia de Pérez y colaboradores, antes citada, podemos decir que, en general, los resultados obtenidos por ellos y los obtenidos en el presente estudio son similares, tanto en la cantidad de medicamentos que presentaron solventes residuales en su composición, como en los solventes identificados. Al respecto, podemos detallar que:

-De los 50 medicamentos de presentación líquida analizados en este trabajo, en 22 de ellos se identificó la presencia de uno o más solventes residuales incluidos en la Guía ICH Q3C de 1997, siendo todos clasificados dentro de la categoría de solventes clase 3.

-En 18 formas farmacéuticas líquidas se detectó sólo 1 solvente residual (principalmente etanol, presente en 16 muestras, acetona en una muestra y 1-butanol en una muestra) y en 4 formas farmacéuticas líquidas se detectaron 2 solventes residuales (en 2 muestras se identificó etanol y etilacetato, y en otras 2 muestras se identificó etanol y acetona).

-De los 50 medicamentos de presentación sólida analizados, en 20 de ellos se identificó la presencia de uno o más solventes residuales incluidos en la Guía ICH Q3C de 1997, siendo clasificados dentro de la categoría de solventes clase 2 y solventes clase 3.

-En 15 formas farmacéuticas sólidas se identificó sólo 1 solvente (en 12 muestras se identificó etanol, en 2 muestras se identificó 2-butanol, en 1 muestra se identificó etilacetato) y en 5 medicamentos de presentación sólida se detectaron 2 solventes residuales (en 2 muestras se detectó el solvente cloroformo y etanol, en otras 2 muestras se detectó tolueno y etanol, y en 1 muestra se identificó el solvente 1-butanol y etanol).

-A diferencia de los resultados obtenidos por Pérez y colaboradores (2006), en el presente estudio no hubo muestras en las que se halla identificado más de 2 solventes residuales a la vez.

-El etanol fue el principal solvente residual identificado en las muestras analizadas, tanto en formas farmacéuticas sólidas (identificado en 17 muestras), como en formas farmacéuticas

líquidas (presente en 20 muestras), resultado comparable con la experiencia de otros autores, que señalan como los principales solventes residuales presentes en preparaciones farmacéuticas a etanol y etilacetato (Liu *et al*, 2003).

Es conocido que el análisis de solventes residuales es una parte esencial en el control de calidad de una sustancia activa, por la toxicidad y potencial riesgo a la salud que significan, y por ende un factor determinante en la comercialización de un medicamento (Klick y Sköld, 2004). Los excipientes farmacéuticos (por ejemplo diluyentes, solubilizantes, emulsificantes, disgregantes, etc.) juegan un rol clave en el mejoramiento de la estabilidad y liberación de un principio activo, y a la vez, pueden influir en menor o mayor medida en el contenido total de solventes residuales en un medicamento, ya que para la obtención de los excipientes farmacéuticos también son usados solventes orgánicos (Fliszar *et al*, 2004). Por esto, es de gran importancia la calidad de un determinado excipiente, el proveedor que certifique dicha calidad, y los análisis de corroboración de la calidad de los excipientes entregados por los proveedores certificados.

En el presente estudio se analizaron formas farmacéuticas líquidas y sólidas, expresadas como producto terminado, disponibles en el mercado nacional y provenientes de diferentes laboratorios farmacéuticos. (Detalladas en el anexo 1).

Los resultados expuestos en la tabla 3.2a nos muestra los solventes residuales presentes en los medicamentos de formas farmacéuticas sólidas analizados, pudiendo observar que en tales muestras fueron identificados tanto solventes clase 2 como solventes clase 3.

Si bien las concentraciones de tolueno y etanol en la muestra S-04 no fueron cuantificadas (en la tabla 3.4i), la presencia de estos solventes en tal muestra sirve para compararlos con los solventes identificados con la muestra S-05, que también contiene tolueno y etanol (datos expuestos en tabla 3.2a). Ambas muestras, S-04 y S-05, corresponden al mismo medicamento, del mismo laboratorio, pero de distinta serie de producción (ver anexo 1). La muestra S-40 también contiene el mismo principio activo, que los medicamentos representados por los códigos S-04 y S-05, pero este es producido por otro laboratorio (detallado en anexo 1), la muestra S-40 no contiene los solventes antes mencionados, pero contiene residuos (trazas) del solvente etilacetato (según tabla 3.2a). Este ejemplo nos sirve para discutir el hecho de que un mismo medicamento –mismo uso terapéutico-, ya sea debido al proceso de síntesis que se utilice para el principio activo, a los excipientes incluidos en su formulación y/o al proceso de producción que utilice cada laboratorio involucrado, puede presentar resultados tan variables como:

- contener solventes residuales clase 2 y clase 3 (tolueno y etanol en las muestras S-04 y S-05),
- alto contenido de un solvente residual clase 3 (contenido de etanol en S-05), o
- niveles traza de un solvente residual clase 3 (contenido de etilacetato en S-40).

La diferencia en estos resultados puede deberse a la formulación del medicamento, ya que aunque las tres muestras son formas farmacéuticas sólidas, S-40 se presenta en comprimido, en cambio S-04 y S-05 corresponden a comprimidos recubiertos, como se detalla en el anexo 1, lo que incluye una etapa adicional en la formulación del medicamento -el recubrimiento del comprimido-, y que puede “presumiblemente” incluir al solvente etanol, ya que muchos polímeros usados para este fin, se disuelven en etanol o isopropanol.

Otro ejemplo lo podemos observar en las muestras S-23 y S-41, las cuales contienen el solvente residual clase 2 cloroformo y el solvente residual clase 3 etanol (según datos expuesto en la tabla 3.2a). Ambas muestras corresponden al mismo medicamento, del mismo laboratorio pero de distinta serie de producción (ver anexo 1). Sin embargo, la muestra S-21 corresponde a un medicamento que también contiene el mismo principio activo que las muestras S-23 y S-41, pero fabricado por otro laboratorio, el cual no incluye estos solventes en el proceso de formulación del medicamento, o si lo hace, los pasos posteriores donde éstos u otros solventes residuales son incluidos, eliminan todo el contenido residual de ellos, ya que en la muestra S-21 no se identificó la presencia de algún solvente residual de interés (ver tabla 3.2a). Como todas las muestras se presentan en comprimidos recubiertos (ver anexo 1), no existe justificación del uso de cloroformo y etanol, por lo menos en el proceso de formulación de la forma farmacéutica del medicamento, pudiendo deberse la presencia de estos solventes por ejemplo a capacidad de producción, costos involucrados, origen del material utilizado, etc.

Las muestras S-09, S-18, S-19, S-43, S-44 y S-48 corresponden a medicamentos que contienen el mismo principio activo, el cual es ampliamente usado (según datos incluidos en el anexo 1, y referencias de P.R. Vademécum, 2006). En todas estas muestras, excepto S-44, no se identificó la presencia de algún solvente residual de interés; sin embargo, en S-44 se identificó el solvente clase 3 etanol (ver tabla 3.2a), que aunque se encontró en un nivel de concentración bajo (ver tabla 3.4i), crea cierta diferencia al pensar que existen cinco laboratorios que están formulando el mismo principio activo en la misma presentación (comprimido) sin la necesidad de usar etanol o removiendo completamente el contenido de éste u otros solventes utilizados, a diferencia del laboratorio productor de la muestra S-44 (ver detalles en el anexo 1).

L-06, L-08, L-09 y L-16 corresponden todas a presentaciones líquidas –gotas orales- del mismo principio activo de las muestras sólidas anteriormente detalladas (P.R. Vademécum, 2006), en base a los resultados obtenidos podemos discutir que:

-En la muestra L-09 se identificó (y cuantificó) el solvente residual clase 3 etanol.

-En la muestra L-08 también se identificó etanol (siendo cuantificado en un nivel de concentración mayor al encontrado en L-09) pero, además, se identificó (y cuantificó) el solvente etilacetato, también perteneciente a la categoría clase 3. (Ver resultados expuestos en la tabla 3.2a y 3.4h).

-En las muestras L-06 y L-16 no se identificó algún solvente residual incluido en la ICH Q3C.

-Resulta de interés el observar que la muestra L-06 y L-09 son formuladas, ambas como gotas orales del mismo principio activo, por el mismo laboratorio, pero con distintos nombres comerciales (P.R. Vademécum, 2006) -ver anexo 1-. Los resultados del presente trabajo nos muestra que L-06 no contiene solventes residuales en su composición, sin embargo, L-09 presenta un bajo contenido residual de etanol (ver tablas 3.2a y 3.4h). De esta forma vemos como un mismo laboratorio puede estar produciendo un “mismo” medicamento que, presumiblemente, utilice excipientes y/o materias primas de distinta calidad, obtenidos de proveedores diferentes, lo que se traduzca en la ausencia o existencia de un determinado solvente residual en la composición del medicamento final y/o en el esfuerzo mayor o menor en eliminar el contenido residual de los solventes utilizados en la formulación del medicamento, que finalmente se traduzcan –como en este ejemplo- en un mayor o menor costo comercial a la población consumidora.

Validación del método analítico utilizado

La técnica de Microextracción en Fase Sólida del Espacio en Cabeza de la muestra (HS-SPME) y Cromatografía de Gas acoplada a Detector de Masas (GC-MS) utilizada en el presente estudio para la determinación de los niveles de concentración de solventes residuales en medicamentos de formas farmacéuticas sólidas y líquidas, tal como se presentan en el producto terminado, constituye una metodología nueva, y por ende no puede compararse con estudios de otros autores, sumándose además, las diferentes condiciones propuestas para la técnica de microextracción y las condiciones operacionales propuestas para el cromatógrafo de gas y detector de masas (mostrados en el punto 2.5 y 2.6.1, respectivamente).

Para los resultados obtenidos de los solventes identificados en muestras de presentación sólida las comparaciones se alejan aún más, ya que la técnica de extracción (HS-SPME) utilizada en este estudio se aplicó directamente a las muestras en estado sólido y en todos los textos consultados los autores extraen los solventes desde muestras sólidas en solución.

Sin embargo, podemos hacernos una idea de la validez de los resultados obtenidos en el presente estudio, al compararlos con los resultados obtenidos por otros autores que buscan objetivos similares, por ejemplo, Liu y colaboradores (2003) utilizaron microextracción en fase sólida del espacio en cabeza de la muestra (HS-SPME) y cromatografía de gas (GC) en la determinación de solventes residuales volátiles en medicamentos, y aunque la fibrilla y condiciones de extracción fueron distintas (fibrilla de PDMS/DVB de 65 μm , temperatura de extracción 0°C, tiempo de extracción 15 minutos, concentración de NaCl controlada en 30% p/v y detector de llamas) demostraron que el método resultó lineal (rango lineal $\geq 10^2$), con coeficientes de determinación (R^2) de 0,9986 para acetona; 0,9994 para etanol y 0,9816 para etilacetato (Liu *et al*, 2003).

En el presente estudio, para los mismos solventes mencionados, se encontraron valores que demuestran que el método propuesto es lineal, ya que se obtuvo para acetona un $R^2 = 0,9941$ y un rango lineal de 790-7900 $\mu\text{g/mL}$, para etanol un $R^2 = 0,9970$ y rango lineal de 786-6288 $\mu\text{g/mL}$ y para etilacetato un $R^2 = 0,9836$ y rango lineal de 90-1799 $\mu\text{g/mL}$ (resultados obtenidos para los solventes identificados en muestras de presentación líquida), datos expuestos en el punto 3.3.1.

Los valores del rango lineal y coeficiente de determinación obtenidos para los solventes estudiados en matriz sólida fueron: $R^2 = 0,9962$ y rango lineal de 5-237 ng/mg para cloroformo, y $R^2 = 0,9948$ y rango lineal de 314-6288 $\mu\text{g/g}$ para etanol, y aunque no existen datos comparables de otros autores, los valores de R^2 obtenidos para estos solventes demuestran linealidad del método analítico empleado, y los rangos lineales incluyen los valores de concentración límite de cada solvente (60 ng/mg para cloroformo y 5000 $\mu\text{g/g}$ para etanol), resultados esperados para los objetivos propuestos.

La precisión obtenida por el método analítico utilizado en el presente estudio, se puede discutir si observamos los valores de la desviación estándar residual (R.S.D) en las tablas 3.4a – 3.4g. Estos valores se obtuvieron con el análisis por triplicado de las muestras en estudio, y se encontraron en el rango de 0,34 a 8,39%. Sólo las muestras S-16 y S-40 presentaron una desviación estándar residual fuera del rango esperado (mayor a 15%), lo cual es aceptable ya que en ambos casos el solvente presentaba niveles traza. Este resultado es comparable con la precisión obtenida con el método utilizado por Liu y colaboradores (2003), donde el rango de la desviación estándar residual (R.S.D.) fue de 1,1 a 8,0%, obtenido por 6 análisis repetidos de las muestras.

Los valores del porcentaje de recuperación de los solventes (R%) obtenidos en este estudio (expuestos en las tablas 3.3.2a y 3.3.2b), demuestran por sí solos la validez del método analítico empleado, ya que se encuentran dentro del rango deseable del porcentaje de recuperación (80-120%) para poder validar un método analítico, con la técnica de adición de estándar utilizada.

El límite de detección de un procedimiento analítico individual es la cantidad mas baja de un analito en una muestra que puede ser detectado pero no necesariamente cuantificado como un valor exacto, mientras que el límite de cuantificación de un procedimiento analítico individual es la cantidad mas baja de un analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con una precisión y exactitud apropiada (ICH Q2A, 1994). Al respecto, los valores del límite de detección (DL) y límite de cuantificación (QL) de los solventes residuales identificados en las muestras analizadas también fueron incluidos en el presente estudio con la finalidad de validar el método analítico propuesto, y aunque no existen datos del DL y QL que puedan compararse con los obtenidos, estos valores son menores al nivel más bajo del solvente detectado en las correspondientes muestras (excepto para el solvente acetona en la muestra L-22) y mucho menores al nivel máximo permitido por regulación (60 ng/mg para cloroformo y 5000 µg/g ó µg/mL para los demás solventes analizados), lo que es suficiente para el desarrollo de este estudio.

El comportamiento del solvente etanol, mediante la técnica analítica utilizada en este trabajo, fue estudiado tanto en matriz líquida como en matriz sólida (ya que este solvente debió cuantificarse en ambas formas farmacéuticas), y al respecto es posible observar que los resultados obtenidos del porcentaje de recuperación (expuestos en tablas 3.3.2a y 3.3.2b) y de los límites de detección y cuantificación (expuestos en tablas 3.3.3a y 3.3.3b) prácticamente no varían desde una matriz a

otra; lo que refuerza los antecedentes sobre las ventajas de la microextracción en fase sólida como método de preparación de muestras para análisis de impurezas, evitando el uso de solventes, facilitando el manejo del equipo y de las muestras, y acortando el tiempo de análisis.

Cuantificación de los solventes residuales identificados en las muestras analizadas

Si bien la identificación y sobretodo la cuantificación de solventes residuales en productos farmacéuticos es primordial para mantener controlado el contenido de estos solventes, que son rutinariamente usados en la síntesis de sustancias activas y formulación de medicamentos, las medidas adoptadas para este fin aún siguen siendo deficientes, lo que queda de manifiesto al desarrollar el presente trabajo y detectar la presencia de varios solventes residuales en medicamentos de uso frecuente, comercializados en todas las farmacias del país.

Al observar los resultados obtenidos en la tabla 3.4h vemos que todos los solventes identificados y cuantificados (excepto el nivel de concentración de acetona en la muestra L-22) en las muestras de formas farmacéuticas líquidas analizadas corresponden a solventes clase 3 -acetona, 1-butanol, etanol y etilacetato- los cuales poseen límites de concentración de 5000 partes por millón, 0,5% o 50 mg por día (detallado en el punto 1.2.1). De estos, el nivel de concentración de etilacetato en L-08 y L-50, aunque varía considerablemente entre una muestra y otra, en ninguna de ellas excede el valor máximo de concentración recomendado por la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH) para el contenido de etilacetato en productos farmacéuticos, lo mismo que los niveles de concentración de acetona en las muestras L-32 y L-40; de 1-butanol en la muestra

L-12; y de etanol en las muestras L-13, L-41 y L-49. Sin embargo, el contenido de etanol en las muestras L-30 y L-47 exceden este valor (5000 ppm o partes por millón).

En las muestras S-23 y S-41 vemos que el nivel de concentración del solvente cloroformo en los medicamentos de formas farmacéuticas sólidas S-23 y S-41 se encuentra bajo el límite de concentración permitido para este solvente (60 ppm o partes por millón), lo que no sucede para el contenido de solvente etanol en las muestras S-01, S-05, S-35 y principalmente en S-03, ya que en dichas muestras los valores de concentración varían de 150 a 260% por sobre el valor límite estimado como seguro (5000 ppm o partes por millón), según la ICH Q3C de 1997.

Sin embargo, aunque este hecho pareciera alarmante, no lo es del todo, ya que por considerarse a etanol como solvente residual perteneciente a la categoría de solventes clase 3, se considera que cantidades incluso cercanas al 1000% sobre el contenido considerado límite para etanol, no genera riesgos a la salud humana (salvo casos específicos) (Liu *et al*, 2003).

La Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH) de 1997 estima valores de la ingesta máxima permitida de un determinado solvente residual en un producto farmacéutico (PDE o exposición diaria permitida) para solventes clase 1 y clase 2, mediante estudios de toxicidad y seguridad humana (ICH Q3C (M), 2005). Estos valores de PDE son los expuestos en las tablas 1.2.1a para solventes clase 1 y en la tabla 1.2.1b para solventes clase 2, y, asumiendo una dosis diaria de 10 gramos de un producto farmacéutico la ICH, además estima los valores de la concentración límite de un solvente residual en un medicamento (valores expuestos en las tablas 1.2.1a y 1.2.1b como concentración límite en ppm).

Sin embargo, la categoría de solventes clase 3 (expuesto en el cuadro 1.2.1a), no poseen valores de PDE específicos para cada uno, sino que, para todos los solventes residuales clase 3, se estima un PDE de 50 mg por día y una concentración límite del contenido en productos farmacéuticos de

0,5% o 5000 partes por millón o ppm. (Detallado en el punto 1.2.1). Además la ICH hace mención, debido al bajo riesgo a la salud que estos solventes significan, a la posibilidad de sobrepasar este valor límite, si existe una justificación en base a la capacidad de manufactura, por ejemplo, que fundamente el uso de elevadas cantidades de solventes clase 3 o la deficiente remoción de estos solventes una vez que son incluidos en la formulación de un medicamento.

Claramente esta justificación para el contenido del solvente etanol en las muestras L-30, L-47, S-01, S-03, S-05, S-35, no están a nuestro alcance, ya que -si los hay- corresponden a documentación confidencial sobre las vías o rutas de obtención de materias primas, protocolos y formulaciones de medicamentos propios de cada laboratorio, debido a lo cual, si bien las muestras antes mencionadas exceden el contenido residual permitido de etanol en productos farmacéuticos, no puede decirse a ciencia cierta si realmente no se está cumpliendo con las especificaciones recomendadas por la Conferencia Internacional sobre Armonización para el contenido de solventes residuales en productos farmacéuticos.

Consecuencias sobre la salud pública

El etanol fue el principal solvente residual presente en los medicamentos estudiados, y sus concentraciones fueron marcadamente mayores que la de los demás solventes identificados y cuantificados en las muestras analizadas.

Ya en el año 1984 existe información que indica que el solvente etanol está presente en más de 700 preparaciones farmacéuticas líquidas, supuestamente como un solvente o diluyente “inerte”, generando preocupación por parte de varias compañías farmacéuticas por sustituir o reducir el

contenido de etanol desde el excesivo número de medicamentos líquidos presentes en el mercado que lo contienen en el rango de concentraciones de 0,3% a 68% (PEDIATRICS, 1984), nos damos cuenta, mediante el presente estudio, que aún no se toman todas las medidas necesarias para limitar el contenido de este solvente en medicamentos, tanto de formas farmacéuticas líquidas como sólidas.

La frecuencia del uso y contenido de etanol en las preparaciones farmacéuticas líquidas orales es principalmente preocupante en productos medicinales dirigidos a la población pediátrica (los niños pueden ser particularmente sensibles a sus efectos hipoglucemiantes), ya sea por el riesgo de intoxicación aguda debido a una sobredosis accidental, como también a la toxicidad asociada a la condición de uso crónico de algunos medicamentos (EMEA/CHMP/PEG/194810/2005).

Medicamentos que contienen etanol también pueden afectar la disposición de otros medicamentos, causar interacciones indeseables entre medicamentos, o inducir reacciones del tipo disulfiram (antabus), con síntomas que incluyen rubor, taquicardia, náuseas, vómitos, y, en su forma severa, arritmias cardíacas, colapso cardiovascular, depresión respiratoria, y convulsiones (PEDIATRICS, 1984).

Si aún seguimos encontrando medicamentos con alto contenido de solventes clase 3, quizás por que se admiten ciertas modificaciones del contenido estimado seguro de estos solventes en base a “justificaciones” pertinentes, entonces debiera exigirse a los laboratorios encargados de la comercialización de un determinado medicamento, la información que incluya la justificación del uso del o los solventes residuales incluidos en un determinado medicamento y su cuantificación.

Al respecto, de los 100 medicamentos analizados en este estudio, sólo se encontró información disponible al consumidor, en lo referente al contenido de etanol en la muestra L-31, donde impreso en la caja del medicamento, en el prospecto informativo dentro de la caja del medicamento y en las monografías disponibles del medicamento (P.R. Vademécum, 2006), se hace referencia al uso de etanol al 30% (p/p) como agente extractivo del principio activo, agregando, además, que el proceso de desecación que se aplica con posterioridad “elimina completamente” del extracto el contenido de alcohol. Este puede ser un ejemplo de la justificación del uso de un solvente en la elaboración de un medicamento, ya que seguramente el agente extractivo etanol logra un mayor rendimiento y/o menor costo en la obtención del principio activo. Sin embargo, en la tabla 3.4h se puede observar el contenido residual de etanol en la muestra L-31, por ende la información disponible no es del todo cierta, considerando los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que el agente extractivo etanol no fue eliminado completamente de la muestra L-31 (ver detalles en el anexo 1).

5. Conclusiones y Proyección del trabajo

Del presente estudio se puede concluir que:

- La técnica de Microextracción en Fase Sólida con Cromatografía de Gas acoplada a Detector de Masas utilizada en este estudio logra parámetros de validación satisfactorios, permitiendo identificar y cuantificar solventes orgánicos residuales provenientes de medicamentos de presentación líquida y sólida, tal como se presentan en el producto comercial.
- El 42% de los medicamentos analizados contienen solventes residuales en su composición, correspondientes a solventes residuales clase 2 y clase 3. No se identificaron solventes residuales clase 1 en las muestras en estudio. El 8% de los medicamentos de formas farmacéuticas sólidas analizados, presentaron solventes clase 2 en su composición. En las formas farmacéuticas líquidas estudiadas no hubo presencia de solventes clase 2. Solventes residuales clase 3 fueron detectados, tanto en formas farmacéuticas líquidas (44%), como en formas farmacéuticas sólidas (40%). Dentro de los solventes clase 3, el más encontrado fue el solvente etanol identificado en el 88% de los medicamentos que presentaron 1 o más solventes residuales en su composición.
- Sólo el solvente etanol, en 4% de los medicamentos de formas farmacéuticas líquidas y en 8% de formas farmacéuticas sólidas, fue cuantificado en concentraciones mayores a las permitidas por regulación.

Teniendo en cuenta los resultados y conclusiones obtenidos, así como los antecedentes bibliográficos recopilados, y considerando que los parámetros clínicos basados en investigaciones para establecer como “seguros” o aceptables los niveles de etanol en los medicamentos aún son visiblemente deficientes, la hipótesis de trabajo del presente estudio se acepta sólo parcialmente, ya que todos los medicamentos de formas farmacéuticas líquidas y sólidas, seleccionados y analizados en este estudio, cumplen con las normativas exigidas en relación a los niveles de concentración de solventes residuales clase 2 y clase 3, excepto etanol, pero se desconoce si existe la documentación a nivel de laboratorios productores y/o distribuidores que informen y/o fundamenten el uso de este solvente, en mayores proporciones, en la formulación de los medicamentos en los que fue detectado.

Finalmente, es necesario destacar que se debe continuar el esfuerzo por remover el contenido de etanol, y el de todos los solventes residuales, desde los medicamentos, y de proveer información a la población consumidora, tanto de la presencia de solventes residuales en un determinado producto farmacéutico como de los problemas de salud pública que estos pudiesen ocasionar.

Los laboratorios productores y/o distribuidores de medicamentos, deberían incluir junto a la documentación del desarrollo farmacéutico de un medicamento, la elección y justificación del uso de un determinado solvente residual en su elaboración (por ejemplo, el etanol puede ser propuesto como un solvente para la granulación y/o para el recubrimiento de formas farmacéuticas sólidas si se ha demostrado que el principio activo es muy sensible a la humedad), y presentar en forma visible y clara la información que advierta la presencia de un solvente residual y el contenido de éste en un determinado medicamento, de tal manera de generar recomendaciones especiales de seguridad ante la presencia de tal solvente (por ejemplo, mayor

supervisión física a la población pediátrica cuando usen medicamentos que contengan etanol, o que las dosis de medicamentos sean prescritos previniendo la acumulación de etanol en sangre debido a la administración crónica de un medicamento, o a efectos de tratamientos simultáneos con otros medicamentos que también contengan etanol).

Sin dejar de mencionar la importancia que tiene el seguir realizando estudios de este tipo, con el propósito de controlar, de alguna manera, el contenido de solventes residuales en medicamentos y/o generar información útil que permita día a día mejorar tanto la metodología empleada para el desarrollo de estos estudios como la información obtenida de ellos, aumentando el interés en la materia y llegando, por fin, a no encontrar solventes residuales como parte de un producto farmacéutico o encontrarlos en cantidades que, con fundamentos, no impliquen ningún riesgo real ni potencial a la salud humana.

6. REFERENCIAS

Aguilar, C., Peñalver, S., Pocurull, E., Borrull, F., Marcé, R.M. (1998) Solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection for the determination of pesticides in aqueous samples, *Journal of Chromatography A.*, 795, 105-115.

Annexes to Impurities: Guideline for Residual Solvent & Guideline on Impurities. Residual Solvent. Annex I: Specifications for class 1 and class 2 residual solvents in active substances. Annex II: Residues of solvents used in the manufacture of finished products. CPMP/QWP/450/03 & EMEA/CVMP 511/03. EMEA 2005.

Bartelt, R. (1997) Calibration of a commercial Solid-Phase Microextraction Device for Measuring Headspace Concentrations of Organic Volatiles, *Analytical Chemistry*, 69, 364-372.

Camarasu, C.C. (2000) Headspace SPME method development for the analysis of volatile polar residual solvents by GC-MS, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 23, 197-210.

Camarasu, C.C., Mezei-Szűts, M., Varga, G.B. (1998) Residual solvents determination in pharmaceutical products by GC-HS and GC-MS-SPME, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 18, 623-638.

Camarasu, C.C., Madichie, C., Williams, R. (2006) Recent progress in the determination of volatile impurities in pharmaceuticals, *Trends in Analytical Chemistry*, 25, 768-777.

COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE (CHMP). REFLECTION PAPER: FORMULATIONS FOR CHOICE FOR THE PAEDIATRIC POPULATION, 2005.

Chiarotti, M., Marsili, R., Moreda-Piñeiro, A. (2002) Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of residual solvent trapped into illicit cocaine exhibits using head-space solid-phase microextraction, *Journal of Chromatography B.*, 777, 249-256.

Decreto Ley N° 264. CHILE. Reglamento del Formulario Nacional de Medicamentos. Ministerio de Salud. Santiago. Chile. Diciembre de 2003. 5p.

Dwivedi, A.M. (2002) Residual Solvent Analysis in Pharmaceuticals, *Pharmaceutical Technology*, 42-46.

Eisert, R., Levsen, K. (1996) Solid-phase microextraction coupled to gas chromatography: a new method for the analysis of organics in water, *Journal of Chromatography A.*, 733, 143-157.

Ethanol in Liquid Preparations Intended for Children, American Academy of Pediatrics, Committee on Drugs, Pediatrics, Vol 73 No 3 March 1984.

Firor, R. L. (2004) The Determination of Residual Solvents in Pharmaceuticals using the Agilent G1888 Network Headspace Sampler, *Agilent Technologies, Inc.* USA. 11p.

Fliszar, K., Wiggins, J.M., Pignoli, C.M. (2004) Analysis of organic volatile impurities in pharmaceutical excipients by static headspace capillary gas chromatography, *Journal of Chromatography A.*, 1027, 83-91.

Flórez, J.C., Fernández, M.L., Fernández, E., Sánchez, J.E., Sanz, A. (2004) Static headspace versus headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) for the determination of volatile organochlorine compounds in landfill leachates by gas chromatography, *Talanta*, 63, 809-814.

Guidance for Industry, Q3C Impurities: Residual Solvent, U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER) Dec. 1997, ICH.

Guimbard, J.P., Person, M., Vergnaud, J.P. (1987) Determination of residual solvents in pharmaceutical products by gas chromatography coupled to a head-space injection system and using an external standard, *Journal of Chromatography*, 403, 109-121.

Hall, B.J., Brodbelt, J.S. (1997) Determination of barbiturates by solid-phase microextraction (SPME) and ion trap gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A.*, 777, 275-282.

Hawthorne, S.B., Miller, D.J. (1992) Solventless determination of caffeine in beverages using solid-phase microextraction with fused-silica fibers, *Journal of Chromatography*, 603, 185-191.

ICH Topic Q 2 A, Validation of Analytical Methods: Definitions and Terminology. NOTE FOR GUIDANCE ON VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS: DEFINITIONS AND TERMINOLOGY, 1994.

ICH Topic Q 2 B, Validation of Analytical Procedures: Methodology. NOTE FOR GUIDANCE ON VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: METHODOLOGY, 1995.

ICH Topic Q3C (M), Maintenance of Note for guidance on impurities: Residual solvent, Permissible Daily Exposure (PDE) for Tetrahydrofuran and N. Methylpyrrolidone, 2005.

INTERNATIONAL Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (4^a,2005).Impurities:Guideline for Residual Solvents Q3C (R3).

Klick, S., Sköld, A. (2004) Validation of a generic analytical procedure for determination of residual solvents in drug substances, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36, 401- 409.

Koster, E.H.M., Wemes, C., Morsink, J.B., de Jong, G.J. (2000) Determination of lidocaine in plasma by direct solid-phase microextraction combined with gas chromatography, *Journal of Chromatography B.*, 739, 175-182.

Krogh, M., Grefslie, H., Rasmussen, K.E. (1997) Solvent-modified solid-phase microextraction for the determination of diazepam in human plasma samples by capillary gas chromatography,

Journal of Chromatography B., 689, 357-364.

Lee, M.-R., Yeh, Y.-C., Hsiang, W.-S., Chen, C.-C. (1998) Application of solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of chlorophenols in urine, *Journal of Chromatography B.*, 707, 91-97.

Legrand, S., Dugay, J., Vial, J. (2003) Use of solid-phase microextraction coupled with gas chromatography for the determination of residual solvents in pharmaceutical products, *Journal of Chromatography A.*, 999, 195-201.

Liu, J., Zhou, Q., Jiang, G. (2003) Determination of volatile residual solvents in traditional Chinese medicines by headspace solid-phase microextraction and cryogenic gas chromatography with flame ionization detection, *Journal of AOAC International*, 86, 461-466.

Lord, H., Pawliszyn J. (2000a) Evolution of solid-phase microextraction technology, *Journal of Chromatography A.*, 885, 153-193.

Lord, H., Pawliszyn J. (2000b) Microextraction of drug, *Journal of Chromatography A.*, 902, 17-63.

Mills, G.A., Walker, V., Mughal, H. (1999) Quantitative determination of trimethylamine in urine by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography B.*, 723, 281-285.

Mills, G.A., Walker, V. (2000) Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials, *Journal of Chromatography A.*, 902, 267-287.

Namera, A., Yashiki, M., Liu, J., Okajima, K., Hara, K., Imamura, T., Kojima, T. (2000) Simple and simultaneous analysis of fenfluramine, amphetamine and methamphetamine in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry after headspace-solid phase microextraction and derivatization, *Forensic Science International*, 109, 215-223.

Otero, R., Carrera, G., Dulsat, J.F., Fábregas, J.L., Claramunt, J. (2004) Static headspace gas chromatographic method for quantitative determination of residual solvents in pharmaceutical drug substances according to European Pharmacopoeia requirements, *Journal of Chromatography A.*, 1057, 193-201.

Page, B.D., Lacroix, G. (1993) Application of solid-phase microextraction to the headspace gas chromatographic analysis of halogenated volatiles in selected foods, *Journal of Chromatography*, 648, 199-211.

Pérez, J.L., del Nogal, M., García, C., Fernández M.E., Moreno, B. (2006) Use of mass spectrometry methods as a strategy for detection and determination of residual solvents in pharmaceutical products, *Analytical Chemistry*, 78, 4901-4908.

Pérez, J.L., del Nogal, M., García, C., Fernández M.E., Moreno, B. (2007) Analysis of class 1

residual solvents in pharmaceuticals using headspace-programmed temperature vaporization-fast gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A.*, 1141, 123-130.

Popp, P., Kalbitz, K., Oppermann, G. (1994) Application of solid-phase microextraction and gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection for the determination of hexachlorocyclohexanes in soil solutions, *Journal of Chromatography A.*, 687, 133-140.

P.R.Vademécum, software program. 2006

Raghani, A.R. (2002) High-speed gas chromatographic analysis of solvents in pharmaceuticals using solid phase microextraction, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29, 507-518.

Sandra, P., David, F., Szücs, R. (2002) Some applications of state-of-the-art capillary gas chromatography in the pharmaceutical industry, *Trends in Analytical Chemistry*, 21, 662-671.

Savary, B.J., Nuñez, A. (2003) Gas chromatography-mass spectrometry method for determining the methanol and acetic acid contents of pectin using headspace solid-phase microextraction and stable isotope dilution, *Journal of Chromatography A.*, 1017, 151-159.

Shirey, R.E. (1994) Fast analysis of environmental samples, using solid phase microextraction (SPME) and capillary GC, *The Reporter*, 13, 2-4.

Theodoridis, G. (2006) Application of solid-phase microextraction in the investigation of protein binding of pharmaceuticals, *Journal of Chromatography B.*, 830, 238-244.

Theodoridis, G., Koster, E.H.M., de Jong, G.J. (2000) Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples, *Journal of Chromatography B.*, 745, 49-82.

Ulrich, S., Kruggel, S., Weigmann, H., Hiemke, C. (1999) Fishing for a drug: solid-phase microextraction for the assay of clozapina in human plasma, *Journal of Chromatography B.*, 731, 231-240.

Ulrich, S. (2000) Solid-phase microextraction in biomedical analysis, *Journal of Chromatography A.*, 902, 167-194.

Wang, X., Jiang, T., Yuan, J., Cheng, Ch., Liu, J., Shi, J., Zhao, R. (2006) Determination of volatile residual solvents in pharmaceutical products by headspace liquid-phase microextraction gas chromatography-flame ionization detector, *Anal Bioanal Chem.*, 385, 1082-1086.

7. ANEXOS

ANEXO 1 Códigos de las muestras que representan los respectivos medicamentos de formas farmacéuticas líquidas y sólidas analizados.

Código muestra	Nombre Comercial	Principio activo	Potencia	Laboratorio	Serie/Lote	Forma Farmacéutica
L-01	Nastizol	Seudofedrina sulfato Clorfenamina maleato	30 mg/ml 1mg/ml	Bagó	S:H50618D	Gotas orales
L-02	Nastul	Seudofedrina sulfato Clorfenamina maleato	30 mg/ml 1mg/ml	Chemopharma	S:0236305	Gotas orales
L-03	Nospasmin Compuesto	Metamizol magnésico Pipetanato clorhidrato	300 mg/ml 6 mg/ml	Sanitas	S:0849206	Gotas orales
L-04	Flapex	Simeticona	40 mg/ml	Silesia	S:4291004	Gotas orales
L-05	Viadil Compuesto	Pargeverina clorhidrato Metamizol magnésico	5 mg/ml 300 mg/ml	Pharma Investi	S:512922	Gotas orales
L-06	Kitadol	Paracetamol	100 mg/ml	Chile	S:06119323	Gotas orales
L-07	Gas off	Simeticona	40 mg/ml	Maver	S:5074545	Gotas orales
L-08	Paracetamol	Paracetamol	100 mg/ml	Valma	S:0440207	Gotas orales
L-09	Paracetamol	Paracetamol	100 mg/ml	Chile	S:06065854	Gotas orales
L-10	Broncodual	Clobutinol	20 mg/5ml	Chile	S:04082055	Jarabe
L-11	Cobefen	Dexclorfeniramina Betametasona	2 mg/5ml 0,25 mg/5ml	Sanitas	S:0903804	Jarabe
L-12	Fasarax	Hidroxicina	20 mg/5ml	Prater	S:4J991	Jarabe
L-13	Valpin	Anisotropina metilbromuro Fenobatbital	10 mg/5ml 8 mg/5ml	Recalcine	S:038C05-1	Gotas orales
L-14	Duo-Val	Clorfenamina maleato Seudofedrina clorhidrato	1 mg/ml 30 mg/ml	Saval	S:107155	Gotas orales
L-15	Cheltin	Hierro	6 mg/ml	Pharma Investi	L:00020	Gotas orales
L-16	Winasorb	Paracetamol	100 mg/ml	Recalcine	S:073D05	Gotas orales
L-17	Bacterol	Trimetoprim Sulfametoxazol	40 mg/5 ml 200 mg/5ml	Recalcine	S:D04211	Suspensión
L-18	Rinoven Compuesto	Paracetamol Seudofedrina clorhidrato Clorfenamina maleato	120 mg/5ml 7,5 mg/5 ml 0,5 mg/5ml	Medipharm	S:0546305	Suspensión
L-19	Histax	Cetirizina	5mg/5ml	Recalcine	S:H-04496	Jarabe
L-20	Nastifrin	Clorfenamina maleato Seudofedrina sulfato	2 mg/5 ml 30 mg/5ml	Chile	S:05026047	Jarabe
L-21	Gasdol	Domperidona	5 mg/5ml.	Bagó	S:C50134A	Suspensión

ANEXO 1 (Continuación)

Código muestra	Nombre Comercial	Principio activo	Potencia	Laboratorio	Serie/Lote	Forma Farmacéutica
L-22	Preclar	Claritromicina	250 mg/5ml.	Chile	S:05058335	Suspensión
L-23	Idon	Domperidona	5 mg/5ml	Saval	S:060214	Suspensión
L-24	Frenaler D	Loratadina Seudoefedrina clorhidrato	2,5 mg/5ml 15 mg/5ml	Chile	S:05025921	Jarabe
L-25	Dibunafon	Dibunato sódico	4 mg/ml	Royal Pharma	S:0841305	Jarabe
L-26	Tol Total	Vitamina A Vitamina B ₁ Vitamina B ₂ Vitamina B ₆ Vitamina B ₁₂ Vitamina C Vitamina D ₃ Vitamina E Vitamina H Vitamina B ₅	2500 UI/5ml 0,9 mg/5ml 1,0 mg/5ml 1,4 mg/5ml 5 mg/5ml 45 mg/5ml 400 UI/5ml 9,83 mg/5ml 85 mg/5ml 11 mg/5ml	Saval	S:010886	Jarabe
L-27	Moxilanic	Amoxicilina	250 mg/5ml	Recalcine	S:MXB5008	Suspensión
L-28	Solvanol	Clobutinol clorhidrato Orciprenalina sulfato	20 mg/5ml 5 mg/5ml	Medipharm	S:0324005	Jarabe
L-29	Cloval compuesto	Clobutinol clorhidrato Orciprenalina sulfato	20 mg/5ml 5 mg/5ml	Saval	S:105994	Solución
L-30	Flagyl	Metronidazol	40 mg/ml	Aventis	S:403773	Suspensión
L-31	Abrilar	Alfa-hederina	7 mg/ml	Pharma Investi	S:05C069-A	Jarabe
L-32	Dislep	Levosulpirida	25 mg/ml	Silesia	S:095918E01	Gotas orales
L-33	Minidol	Tramadol	100 mg/ml	Andrómaco	S:D6292	Gotas orales
L-34	Trioval	Paracetamol Seudoefedrina clorhidrato Clorfenamina maleato	120 mg/ml 7,5 mg/ml 0,75 mg/ml	Saval	S:056916	Gotas orales
L-35	Deflamat NF	Diclofenaco potásico	15 mg/ml	Andrómaco	S:L4215	Gotas orales
L-36	Maltofer	Hierro	50 mg/ml	Andrómaco	S:D5327	Gotas orales
L-37	Buscapina	N-metilbromuro de Hioscina	10 mg/ml	Boehringer Ingelheim	C002	Gotas orales
L-38	Clarinase	Loratadina Seudoefedrina sulfato	2,5 mg/5ml 15 mg/5ml	Schering - Plough	L:3LSGA05	Jarabe
L-39	Diaren	Nifuroxazida Atapulgita	200 mg/5ml 500 mg/5ml	Saval	S:032685	Suspensión
L-40	Infex	Claritromicina	250 mg/5ml	Recalcine	S:F05415	Suspensión
L-41	Brontal	Trimetoprim Sulfametoxazol	40 mg/5 ml 200 mg/5ml	Recalcine	S:D04211	Suspensión
L-42	Degraler	Levocetirizina diclorhidrato	2,5 mg/5ml	Bagó	L:F60522B	Jarabe

ANEXO 1 (Continuación)

Código muestra	Nombre Comercial	Principio activo	Potencia	Laboratorio	Serie/Lote	Forma Farmacéutica
L-43	Sulcran	Sucralfato	100mg/ml	Silesia	S:4261004	Suspensión
L-44	Mailen	Desloratadina	0,5 mg/ml	Pharma Investi	L00004	Jarabe
L-45	Gamalate B6	GABA ^(a) GABOB ^(b) BGM ^(c) Vitamina B ₆	100 mg/5ml 50 mg/5ml 100 mg/5ml 50 mg/5ml	Andrómaco	S:D6521	Jarabe
L-46	Restol	Domperidona	10 mg/ml	Chile	S:05047421	Gotas orales
L-47	Sinpasmon	Pipenzolato bromuro Fenobarbital	4 mg/ml 6 mg/ml	Sanitas	S:1223804	Gotas orales
L-48	Dalun	Hidroxicina clorhidrato	10 mg/5ml	Medipharm	S:1115704	Jarabe
L-49	Amoval	Amoxicilina	500 mg/5ml	Saval	S:107095	Suspensión
L-50	Amoxicilina	Amoxicilina	500 mg/5ml	Chile	S:05047028	Suspensión
S-01	Enalapril maleato	Enalapril maleato	10 mg	Andrómaco	S:G5298	Comprimido
S-02	Glibenclamida	Glibenclamida	5 mg	Bestpharma	S:040403	Comprimido
S-03	Hidroclorotiazida	Hidroclorotiazida	50 mg	Bestpharma	S:HZ041113	Gotas orales
S-04	Fluoxetina	Fluoxetina	20 mg	Baden	S:0817505	Comp. rec. (*)
S-05	Fluoxetina	Fluoxetina	20 mg	Baden	S:0101205	Comp. rec. (*)
S-06	Metropast	Metronidazol	500 mg	Pasteur	S:008555	Comprimido
S-07	Arendal	Alendronato	70 mg	Pharma Investi	L00018	Comprimido
S-08	Amoxicilina	Amoxicilina	500 mg	Bestpharma	S:AM041103	Comprimido
S-09	Zolben	Paracetamol	500 mg	Novartis	S:32103-01	Comprimido
S-10	Labotensil	Atenolol	50 mg	Labomed	S:503234	Comprimido
S-11	Zaldiar	Paracetamol Tramadol clorhidrato	325 mg 37,5 mg	Grünenthal	S:223I	Comp. rec. (*)
S-12	Bi-Euglucon-M	Glibenclamida Metformina	5 mg 500 mg	Roche	S:X26245	Comprimido
S-13	Migratam	Ergotamina tartrato Cafeína Metamizol	1 mg 100 mg 300 mg	Chile	S:05123037	Comp. rec. (*)
S-14	Co-trimoxazol	Sulfametoxazol Trimetoprim	800 mg 160 mg	Chile	S:05026173	Comprimido
S-15	Ketoprofeno	Ketoprofeno	50 mg	Mintlab	S:5C147	Cápsula
S-16	Mivit-C	Vitamina C	100 mg	Medcell	S:0260805	Comprimido
S-17	Micardis Plus	Telmisartan Hidroclorotiazida	80 mg 12,5 mg	Boehringer Ingelheim	L:R2310	Comprimido
S-18	Paracetamol	Paracetamol	500 mg	Volta	BN°5041ET	Comprimido

ANEXO 1 (Continuación)

Código muestra	Nombre Comercial	Principio activo	Potencia	Laboratorio	Serie/Lote	Forma Farmacéutica
S-19	Paracetamol	Paracetamol	500 mg	Bestpharma	S:PR040906	Comprimido
S-20	Nimicor	Simvastatina	10 mg	Recalcine	S:076E05	Comprimido
S-21	Nimodipino	Nimodipino	30 mg	Andrómaco	S:J5037	Comp. rec. (*)
S-22	Calmosedan	Clomezanona Diazepam	100 mg 2,5 mg	Recalcine	S:K04730	Comprimido
S-23	Nimodipino	Nimodipino	30 mg	Chile	S:03127233	Comp. rec. (*)
S-24	Ibuprofeno	Ibuprofeno	400 mg	Mintlab	S:6B062	Comp. rec. (*)
S-25	Ibuprofeno	Ibuprofeno	400 mg	Chile	S:04124944A	Comp. rec. (*)
S-26	Lipistat	Lovastatina ^(d)	4,8 – 5,28 mg	Knop	S:0503816	Cápsulas
S-27	Ginemaxim	Glucósidos triterpénicos ^(e)	1 mg	Knop	S:0410086	Comprimidos
S-28	Concor	Bisoprolol fumarato	10 mg	Merck	S:2691906	Comp. rec. (*)
S-29	Glafofil	Metformina clorhidrato	500 mg	Merck	S:1370804	Comp. rec. (*)
S-30	Enalapril maleato	Enalapril maleato	10 mg	Bestpharma	S:040203	Comprimido
S-31	Eutirox	Levotiroxina sódica	50 mcg	Merck	S:1260705	Comprimido
S-32	Metamizol sódico	Metamizol sódico	300 mg	Valma	S:0291105	Comprimido
S-33	Nitroglicerina	Nitroglicerina	0,6 mg	Chile	S:04122454	Comprimido
S-34	Glifortex	Metformina clorhidrato	850 mg	Andrómaco	S:C5109	Comp. rec. (*)
S-35	Clorfenamina maleato	Clorfenamina maleato	4 mg	Andrómaco	S:E5611	Comp. rec. (*)
S-36	Lovastatina	Lovastatina	20 mg	Bestpharma	S:LV050303	Comprimido
S-37	Ciprofloxacino	Ciprofloxacino	500 mg	Bestpharma	S:0020903	Comprimido
S-38	Foli-Doce	Ácido fólico Vitamina B ₁₂	400 µg 2 µg	ITF fama Chile	S:507551	Comprimido
S-39	Famotidina	Famotidina	40 mg	Bestpharma	S:FM050501	Comprimido
S-40	Fluoxetina	Fluoxetina	20 mg	Andrómaco	S:L6845	Comprimido
S-41	Nimodipino	Nimodipino	30 mg	Chile	S:06086843A	Comp. rec. (*)
S-42	Eurogesic	Naproxeno sódico	275 mg	Saval	S:071935	Comprimido
S-43	Paracetamol	Paracetamol	500 mg	Chile	S:05047084	Comprimido
S-44	Gesidol	Paracetamol	500 mg	Med-cell	S:4123598	Comprimido
S-45	Nefersil Fast	Clonixinato de lisina	125 mg	Pharma Investi	L:00018	Cápside
S-46	Diclofenaco sódico	Diclofenaco sódico	50 mg	Chile	S:04071609	Comprimido

ANEXO 1 (Continuación)

Código muestra	Nombre Comercial	Principio activo	Potencia	Laboratorio	Serie/Lote	Forma Farmacéutica
S-47	Ranitidina	Ranitidina	150 mg	Bestpharma	S:CT0152	Comprimido
S-48	Kitadol	Paracetamol	500 mg	Chile	S:05123395	Comprimido
S-49	Calcigran D	Calcio Vitamina D	320 mg 125 UI	Labomed	S:040756	Cápsula
S-50	Furosemida	Furosemida	40 mg	Sanitas	S:0726403	Comprimido

(*): Comprimido recubierto.

(a): GABA: Ácido gammaaminobutírico

(b): GABOB: Ácido gammaamino beta hidroxibutírico

(c): BGM: Bromhidrato de glutamato de magnesio.

(d): extracto seco de levadura de arroz (*Monascus purpureus Went*) 400mg (equivalente a 4,80-5,28mg de lovastatina).

(e): Extracto seco estandarizado de *Cimicifuga racemosa* spp. 40mg (equivalente a 1mg de glucósidos triterpénicos).