

Calificación de un sistema de HPLC-IR para la determinación de impurezas en vacunas

Quality of a HPLC-IT system for determination of impurities in vaccines

Matilde Cuevas Valdespino^I; José Pérez Cantillo^{II}; Manuel Hernández Hernández^{III}; Mirtha Castiñeira Díaz^{IV}; Jenny Márquez Rodríguez^V

^ILicenciada en Bioquímica. Máster en Bioquímica. Investigadora Agregada. Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas. La Habana, Cuba.

^{II}Ingeniero en Telecomunicaciones. Especialista en Metrología. Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas. La Habana, Cuba.

^{III}Ingeniero Radioelectrónico. Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas. La Habana, Cuba.

^{IV}Doctora en Ciencias Farmacéuticas. Profesor Titular. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

^VTécnico en Farmacia Industrial. Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas. La Habana, Cuba.

RESUMEN

La calificación de los diferentes componentes del sistema HPLC es un aspecto de vital importancia para el logro de buenos resultados en la validación de un método analítico, pues se necesita demostrar previamente que el sistema se encuentra trabajando de forma satisfactoria. En este caso la evaluación reviste una gran importancia, por tratarse de instrumentos de varios años de uso, con los que el fabricante no se responsabiliza, por lo que se recopiló información de instrumentos similares producidos por otros fabricantes o establecidos para versiones modernas de estos donde se describiera la forma de evaluar los parámetros más importantes en el funcionamiento de cada uno de los componentes del sistema cromatográfico a usar. Para calificar la bomba isocrática (Pharmacia-LKB), se evaluó la función de bombeo, la indicación del cero de presión, el límite mínimo y máximo de presión, así como la prueba de hermeticidad y la exactitud del flujo. Para calificar el detector de índice de refracción (Knauer), se

evaluó la señal de ruido, la sensibilidad y la linealidad de la señal. Además se calculó la precisión del inyector. Se determinó que tanto la bomba isocrática como el detector de índice de refracción y el inyector manual cumplen con todos los parámetros estudiados, lo que demuestra que todos los componentes del sistema de HPLC cumplen con las especificaciones establecidas y adecuadas a sus características, además de satisfacer los requerimientos necesarios para la determinación de impurezas mediante esta tecnología.

Palabras clave: Calificación, HPLC, índice de refracción.

ABSTRACT

The assessment of different components of HPLC system is a very important feature to achieve good results in validation of an analytical method since it is necessary to demonstrate previously that this system is working in a satisfactory way. In present case the assessment is very important to be about of instruments of some years of use where the manufacturer not accept responsibility for the information collected on similar instruments produced by other manufacturers for current versions of these where is described the way to assess the more significant parameters in the functioning of each components of chromatographic system to be used. To assess the isocratic pump (Pharmacia-LKB) pumping function, zero-pressure indication, minimal and maximal pressure limit, as well as the sealed test and flow accuracy. To determine the refraction rate detector (Knauer), the noise, sensitivity and linearity signal was assessed. Also, the injector's accuracy was estimated. Authors determined that the isocratic pump as refraction rate detector and the manual injector fulfill with all study parameters demonstrating that all components of HPLC system also fulfill with specifications established and suitable to its features, satisfying the requirements necessary for determination on impurities using this technology.

Key words: Assessment, HPLC, refraction rate.

INTRODUCCIÓN

Las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) son de obligatorio cumplimiento para la Industria Farmacéutica, estas consisten en un manual de la organización, un plan maestro de validaciones, procedimientos normalizados de operación y los registros. Cubren todos los aspectos de la producción: materias primas, instalaciones, equipos, entrenamiento e higiene del personal, detallando por escrito el procedimiento para cada proceso que podría afectar la calidad del producto final. Es decir, las BPM no son más que un conjunto de normas y procedimientos a seguir para lograr que los productos sean fabricados de manera consistente y acorde a ciertos estándares de calidad, en este último aspecto desempeñan una función fundamental las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) y dentro de ellas la validación de métodos analíticos.

La calificación se considera una parte del proceso de validación, que verifica los diferentes módulos o equipos y la resolución del sistema antes de que estos sean utilizados en el trabajo diario.¹ Es por ello que la calificación de los diferentes componentes del sistema HPLC es un aspecto de vital importancia para el logro de buenos resultados en la validación de un método analítico, pues se necesita demostrar previamente que el sistema se encuentra trabajando de forma satisfactoria.² En este caso la evaluación reviste una gran importancia, por tratarse de instrumentos de varios años de uso, con los que el fabricante no se responsabiliza, por lo que se recopiló información de instrumentos similares producidos por otros fabricantes o establecidos para versiones modernas de estos, donde se describiera la forma de evaluar los parámetros más importantes en el funcionamiento de cada uno de los componentes del sistema cromatográfico a usar.

MÉTODOS

Calificación de la bomba isocrática para HPLC (Pharmacia-LKB)

Para realizar la evaluación de la bomba isocrática para HPLC de Pharmacia-LKB fue necesario seguir el procedimiento descrito por Merck Hitachi en 1996 para su bomba isocrática LaChrom-7110,³ teniendo en cuenta las especificaciones de la bomba evaluada.⁴

Para evaluar el funcionamiento de este componente se determinaron los siguientes parámetros:

- Función de bombeo. Se programó la bomba con los siguientes parámetros: velocidad de flujo 1 mL/min, presión máxima 400 bar, presión mínima 0 bar. Se puso en funcionamiento la bomba y se purgó esta (aproximadamente 1 min) para asegurar que no quedaran burbujas en el sistema. Al detener la purga, sin detener la bomba se escuchó si el sonido de esta era mucho más lento que cuando estaba funcionando la función de purga. Posteriormente, se programó la velocidad de flujo de la bomba a 5 mL/min y se escuchó el sonido de la bomba a cuando la velocidad de flujo era de 1 mL/min.
- Indicación del cero de presión. Con la bomba funcionando se programó un flujo de 1 mL/min y se abrió la válvula de drenaje (purga), se observó la lectura del indicador de presión.
- Límite mínimo de presión. Utilizando agua para HPLC como fase móvil, se programó la bomba con los parámetros: velocidad de flujo 1 mL/min, límite mínimo de presión 3 bar. Por otro lado, se cerró la válvula de drenaje y se conectó un capilar de 0,25 mm para que aumentara la presión de retorno a la bomba hasta al menos 5 bar. Luego, se puso en funcionamiento la bomba y tan pronto como esta alcanzó una presión de al menos 5 bar, se abrió la válvula de drenaje, observándose el comportamiento de la bomba durante 40 s.³
- Límite máximo de presión. Utilizando agua para HPLC como fase móvil, se programó la bomba con los siguientes parámetros: velocidad de flujo 2 mL/min, límite máximo de presión 40,0 mPa. Por otra parte, se cerró herméticamente la válvula de drenaje y la salida de fase móvil de la bomba con un tapón ciego M16 de titanio; luego, se puso en funcionamiento la bomba y se observó su comportamiento.
- Prueba de hermeticidad. Una vez que la bomba se detuvo en la prueba anterior se presionó la tecla stop y se chequeó la presión que mantenía el sistema después de transcurridos 5 min.
- Exactitud del flujo. Utilizando agua para HPLC como fase móvil, se programó la bomba a una velocidad de flujo de 1 mL/min, luego se puso en funcionamiento,

asegurando que no había burbujas en el sistema. El flujo de salida fue colectado durante 5 min en un matraz aforado de 5 mL o en un bulbo de vidrio de 10 R (pesados previamente), utilizando para ello un cronómetro. El contenido exacto del matraz o el bulbo fue determinado por diferencia de pesada antes y después. Esta operación fue repetida 5 veces y se determinó el promedio entre estas.

Calificación del detector de índice de refracción (Knauer)

Para evaluar el funcionamiento de este instrumento se determinaron los siguientes parámetros:

- Señal de ruido.^{5,6} Se programó el detector con los siguientes parámetros: "Range": 2 y "Time constant", 0,25. Con las celdas de referencia y de muestra llenas de agua para HPLC filtrada y con la bomba detenida, se registró la señal emitida por el detector durante 1 h. A partir de la señal registrada se seleccionó un segmento de 10 min, dentro del cual se calculó el ruido (R) del detector en 4 segmentos de 1 min cada uno, denominados A_1 , A_2 , A_3 y A_4 respectivamente, utilizando las siguientes fórmulas:

$$B \text{ mV} = (\text{Cant de mV contenidos en la escala} \times B \text{ mm})/a$$

donde:

B mV: ancho en mV de variación en el segmento de 10 min analizado.

B m: ancho en mm de la variación en el segmento de 10 min analizado

A: medida en mm contenidos en la escala del eje Y

$$R \text{ (mV)} = (B \text{ mV} / B \text{ mm}) \times A \text{ (mm)}$$

Se calculó el promedio entre los 4 valores de R determinados.

- Sensibilidad.⁵ Se programó el detector con los siguientes parámetros: "Range", 2 y "Time constant", 1. Con las celdas de referencia y de muestra llenas de agua para HPLC filtrada y la bomba detenida, se registró la señal emitida por el detector durante 5 min, se giró el botón "coarse" 6 vueltas completas hacia la derecha y se verificó si se producía algún cambio en la señal detectada.

- Linealidad.⁵ Se conectó un capilar de PTFE de 0,25 mm (i.d.) en el lugar de la columna (entre el inyector y el refractómetro) y utilizando como fase móvil agua para HPLC filtrada, a un flujo de 1 mL/min, se programaron en el refractómetro los siguientes parámetros: "Range", 2; "Time constant", 1. Se inyectaron por triplicado 5 soluciones de referencia de glucosa a diferentes concentraciones (2, 3, 4, 5 y 6 %). Se determinó el coeficiente de determinación (r^2) de la recta promedio obtenida con las áreas de los picos registrados para cada una de las concentraciones.

Determinación de la precisión del inyector

Para realizar esta evaluación se conectó un capilar de PTFE de 0,25 mm (i.d.) en el lugar de la columna (entre el inyector y el refractómetro) y utilizando como fase móvil agua para HPLC filtrada, a un flujo de 1 mL/min, se programaron en el refractómetro los siguientes parámetros: "Range", 2; "Time constant", 1. Se

realizaron 10 inyecciones de una solución de referencia de glucosa al 5 % y se determinó el coeficiente de variación (CV) de las áreas y de las alturas de los picos obtenidos.

RESULTADOS

En un sistema de HPLC, la bomba constituye una de sus partes más importantes, porque de su buen funcionamiento depende la calidad de la separación y la precisión del ensayo, sobre todo en un método cuantitativo. En la tabla 1 aparece el resultado de la evaluación de los diferentes parámetros para la calificación de la bomba isocrática en estudio

Tabla 1. Resultados obtenidos en la calificación de la bomba isocrática para HPLC

Parámetros evaluados	Especificación adecuada	Resultado
Función de bombeo	El sonido de la bomba es mucho más lento que cuando estaba la "purga"	Cumple
	El sonido de la bomba es mucho más rápido que cuando la velocidad de flujo era de 1 mL/min	Cumple
Indicación del cero de presión	El indicador de presión retorna a $0 \pm 0,1$ Mpa	Cumple
Límite mínimo de presión	La presión retorna a 0 y la bomba para automáticamente	Cumple
Límite máximo de presión	Cuando la presión alcance el máximo, la bomba para automáticamente	Cumple
Prueba de hermeticidad	La presión debe ser de al menos 30,0 Mpa	36,0 Mpa
Exactitud del flujo n= 5	El peso promedio debe ser $5 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ $C < 1 \%$	5,009 g 0,4312 %

Otro componente del sistema HPLC de vital importancia resulta ser el detector de índice de refracción (refractómetro Knauer), utilizado en el método que se desea validar. Para realizar la calificación de este instrumento se siguió básicamente el procedimiento descrito por el propio fabricante para una versión moderna de sus refractómetros;⁶ además se tuvieron en cuenta las especificaciones del detector evaluado.

En la figura 1 aparece el cromatograma resultante de la evaluación del ruido del detector en un período de 10 min y en la figura 2 se representa la recta promedio obtenida a partir de las áreas de los picos de diferentes concentraciones de glucosa registrados para estudiar la linealidad de la señal del detector calificado, mientras que en la tabla 2 se resumen los resultados obtenidos al evaluar los diferentes parámetros de calificación del refractómetro diferencial.

Tabla 2. Resultados obtenidos en la calificación del refractómetro Knauer

Parámetros evaluados	Especificación adecuada	Resultado
Señal de ruido n= 4	El promedio del ruido calculado debe ser menor que 8×10^{-2} mV	$3,558 \times 10^{-3}$ mV
Sensibilidad	Se detecta un cambio considerable en la lectura de la pizarra y en la señal registrada	Cumple
Linealidad	El coeficiente de determinación (r^2) de la recta promedio de los puntos evaluados debe ser $\geq 0,99$	0,992

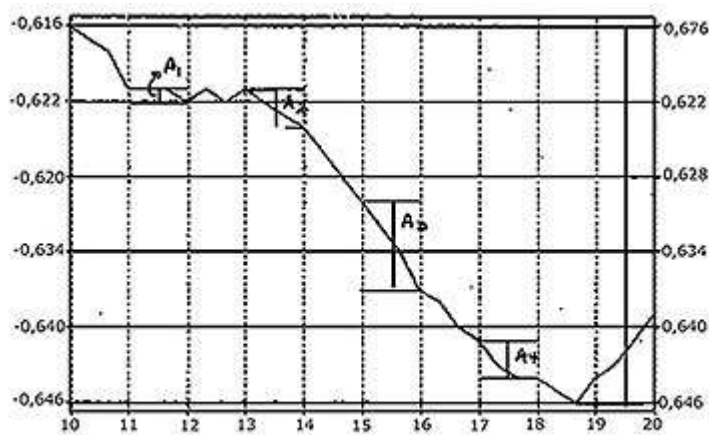


Fig. 1. Determinación de la señal de ruido del refractómetro Knauer.

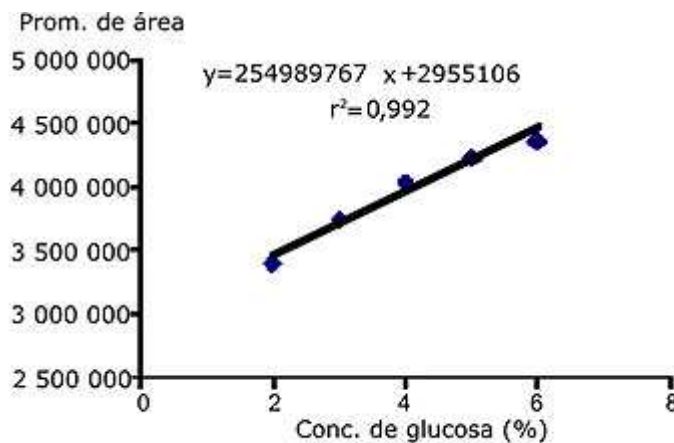
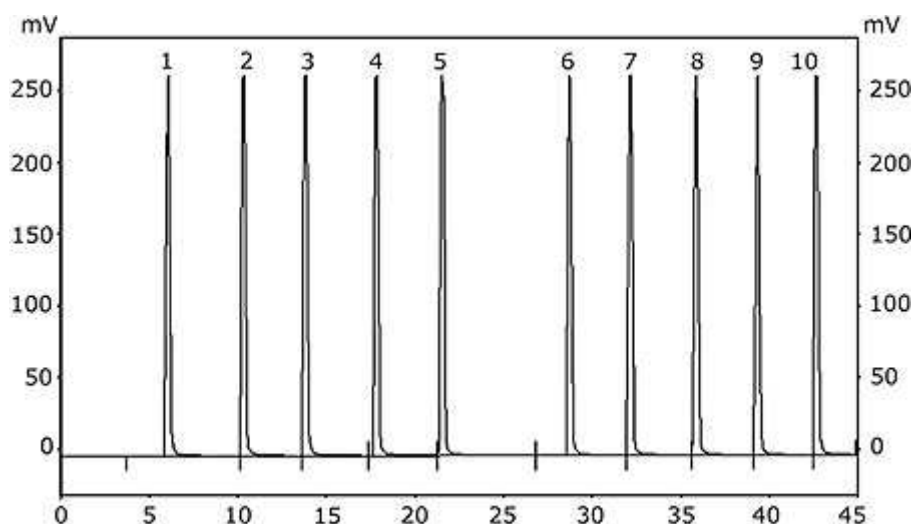


Fig. 2. Evaluación de la linealidad del refractómetro Knauer.

Por otra parte, la [figura 3](#) muestra el cromatograma obtenido al evaluar la precisión del inyector utilizando una solución patrón de glucosa al 5 %, y en la [tabla 3](#) aparece un cuadro resumen de los resultados del área y de la altura obtenidos para los picos detectados.

Tabla 3. Resultados del estudio de precisión del inyector manual

Muestra (n= 10)	Área	Altura
Valor medio	4198183,1	265457,1
DE	19883,139	426,988
CV (%)	0,474	0,161
Recomendado	CV < 1 %	CV < 1%

**Fig. 3.** Evaluación de la precisión del inyector manual.

DISCUSIÓN

Los resultados mostrados en la [tabla 1](#) demuestran que la bomba en estudio cumple con las especificaciones establecidas y adecuadas a las características del equipo. Teniendo en cuenta estos resultados se puede afirmar que el instrumento bombea correctamente, que el regulador de presión está ejerciendo su función como es debido, que no existen fugas de líquido causado por problemas con los sellos de los pistones o conexiones, así como que por parte de la bomba está garantizada la precisión del ensayo, teniendo en cuenta la exactitud y repetibilidad del flujo, pues el CV de este último parámetro evaluado es lo suficientemente bajo como para ello.

En el cromatograma resultante de la evaluación del ruido del detector en un período de 10 min ([fig. 1](#)) se pueden observar los 4 segmentos ($A_1/A_2/A_3/A_4$) que se tuvieron en cuenta para realizar el cálculo correspondiente ([tabla 2](#)), mientras que en la figura 2 se puede apreciar como el detector evaluado es capaz de emitir una señal con una linealidad adecuada para el análisis.⁷

Al analizar los resultados de los parámetros de calificación del refractómetro diferencial se considera que estos son adecuados, teniendo en cuenta que se trata de una versión anterior de estos instrumentos la cual no es completamente digitalizada. Además, los valores obtenidos, específicamente para la señal de ruido y la linealidad satisfacen los requerimientos necesarios para el ensayo de determinación de impurezas en vacuna que se desea validar.

El comportamiento de los picos obtenidos en el estudio de la precisión del inyector fue muy similar, para cada una de las réplicas evaluadas ([fig. 3](#)), lo que se refleja en un CV menor que el 1 % tanto para el área como para la altura del pico ([tabla 3](#)), por lo que cumplen con lo recomendado por la FDA en estos casos.⁸ Se puede apreciar que el CV del área es mayor que el de la altura debido a que este es un parámetro que se afecta más con las pequeñas variaciones del pico, pero brinda mayor información de la calidad de la separación cromatográfica, por lo que teniendo en cuenta que el método de nuestro interés es cuantitativo se decidió usar este parámetro para realizar todos los cálculos de concentración de la impureza a determinar. Además considerando que el volumen de inyección era constante y con bucle lleno, no fue necesaria la evaluación de la linealidad del inyector.

No se evaluó la precisión de la temperatura del horno de columna, debido a que la regulación para la validación de métodos cromatográficos de la FDA de 1994,⁸ considera que la realización de una prueba de aptitud o idoneidad del sistema como parte de la validación del método analítico, es suficiente para evidenciar un buen funcionamiento de este componente del sistema. No obstante se garantizó que este estuviera debidamente calibrado en la temperatura de análisis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Search Center. Biology Proteome Krea University. Qualification of HPLC. (*cited* Sept 2008). Available from: http://www.bioqc.org/workshopdata/Kimchanwha_qualificationofhplc.ppt
2. WHO. Technical Report Series 937. Expert Committee on specifications for pharmaceutical preparations. Analytical method validation Geneva: WHO Press; 2006. p. 136-40.
3. Merck. LaChrom. Model L-7110 Pump. Instruction Manual. Tokio: Hitachi, Ltd; 1996.
4. Pharmacia Biotech. HPLC Pump 2248. Instruction Manual. Uppsala: Pharmacia Biotech AB; 1994.
5. Knauer. Differential Refractometer A0298. Instruction Manual. Berlin: Knauer Press; 1994.
6. Knauer. SOP Testing the function and the specifications for the WellChrom Differential RefractometerK-2301 and K-240. Berlin: Knauer Press; 2001.
7. Knauer. Quality assurance. Test report Function Test to Smartline Refraction Index Detector K-2301 and K-2401. Berlin: Knauer Press; 2008.
8. Center for drug evaluation and research de la FDA (CDER): Reviewer Guidance. Validation of Chromatographic methods, Beltsville: FDA Press; 1994.

Recibido: 8 de junio de 2010.
Aprobado: 17 de julio de 2010.

Lic. *Matilde Cuevas Valdespino*. Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas. Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, municipio Playa, La Habana, Cuba.