

Validación de la Técnica Analítica Empleada para la Cuantificación de Agentes Citostáticos en Unidades de Farmacia Oncológica y Estaciones de Enfermería

Autor: Claudio Müller

Fecha: Noviembre 2014

Lugar de la validación: Laboratorio de Higiene y Toxicología Industrial, Positiva ARL, Bogotá, Colombia

1. Condiciones cromatográficas (HPLC) empleadas para la identificación y cuantificación de Ifosfamida, Ciclofosfamida y Paclitaxel

Fase estacionaria: Columna LichroCart® C18 100 x 4.6 mm, 5 µm tamaño de partícula

Fase móvil: Acetonitrilo: buffer fosfato pH 6, elución con gradiente

Tiempo (minutos)	Proporción acetonitrilo (%)	Proporción buffer pH 6* (%)	Flujo (mL/min)
0	25	75	1.0
7	25	75	1.0
10	60	40	1.0
15	60	40	1.0
20	25	75	1.0
25	25	75	1.0

*Buffer fosfato pH 6: KH_2PO_4 1.1936 g; K_2HPO_4 0.2143 g; ajustar pH con ácido fosfórico concentrado

Longitud de onda de detección: 195 nm

Volumen de inyección: 20 µL

Instrumento: Cromatógrafo de líquidos Merck Hitachi, detector de radiación ultra violeta L4250, bomba terciaria L-6200A, interfase D6000, inyector manual y programa de adquisición de datos "Chromatography Data Station Manager"

2. Preparación de soluciones estándar a partir de medicamentos proporcionados por la unidad de farmacia oncológica del Instituto Nacional de Cancerología

Ifosfamida solución inyectable: 50 mg/mL

Ciclofosfamida (Endoxan) polvo para reconstitución: 1 gramo en 50 mL de agua esterilizada.

Paclitaxel (Taxol): 1 mg/mL

A partir de estas soluciones se preparan las siguientes disoluciones para la elaboración de una curva de calibración que permita cuantificar muestras ambientales que contengan contaminación con alguna de estas tres sustancias.

Ifosfamida: 100 µg/mL en agua desionizada

Ciclofosfamida: 240 µg/mL en agua desionizada

Paclitaxel: 100 µg/mL en agua desionizada

3. Elaboración de las curvas de calibración para Ifosfamida, Ciclofosfamida y Paclitaxel

Curva de calibración para Ifosfamida:

Concentración (µg/mL)	Volumen final (µL)	Solvente de dilución
3.0	1000	Fase móvil
5.0	1000	Fase móvil
7.5	1000	Fase móvil
10.0	1000	Fase móvil
12.5	1000	Fase móvil
15.0	1000	Fase móvil

Curva de calibración para Ciclofosfamida:

Concentración (µg/mL)	Volumen final (µL)	Solvente de dilución
2.5	1000	Fase móvil
5.0	1000	Fase móvil
7.5	1000	Fase móvil
10.0	1000	Fase móvil
12.5	1000	Fase móvil
15.0	1000	Fase móvil

Curva de calibración para Paclitaxel:

Concentración (µg/mL)	Volumen final (µL)	Solvente de dilución
1.0	1000	Fase móvil
3.0	1000	Fase móvil
6.0	1000	Fase móvil
9.0	1000	Fase móvil
12.0	1000	Fase móvil
15.0	1000	Fase móvil

4. Resultados de linealidad para Ifosfamida, Ciclofosfamida y Paclitaxel

Sustancia	Ecuación de regresión lineal	Coefficiente de correlación
Ifosfamida	$y = 2227,4x - 0,4008$	$R^2 = 0,9934$
Ciclofosfamida	$y = 2211,3x - 1249,1$	$R^2 = 0,9941$
Paclitaxel	$y = 86543x - 25469$	$R^2 = 0,9969$

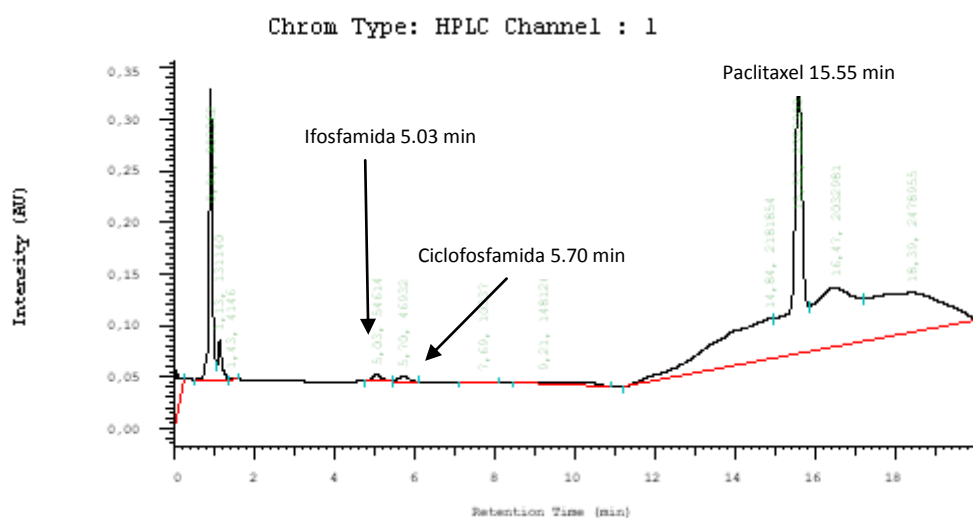
5. Resultados de límite de detección y cuantificación para Ifosfamida, Ciclofosfamida y Paclitaxel

Sustancia	Límite de detección* (µg/mL)	Límite de cuantificación** (µg/mL)
Ifosfamida	0.010	0.020
Ciclofosfamida	0.064	0.195
Paclitaxel	0.043	0.131

*cálculo basado en la expresión $LOD = (3.3 \cdot s) / b$; s: desviación estándar del intercepto de la curva de calibración; b: pendiente de la curva de calibración

**cálculo basado en la expresión $LOQ = (10 \cdot s) / b$; s: desviación estándar del intercepto de la curva de calibración; b: pendiente de la curva de calibración

6. Cromatograma representativo de una solución estándar conteniendo Ifosfamida, Ciclofosfamida y Paclitaxel



Solución estándar de Ifosfamida, Ciclofosfamida, Paclitaxel (20 µg/mL), solvente de disolución fase móvil. Condiciones cromatográficas: ver punto N° 1.

7. Estudio de exactitud y precisión del método

Se elaboraron soluciones estándar de concentraciones conocidas de Ifosfamida (5, 10 y 20 µg/mL), Ciclofosfamida (5, 10 y 20 µg/mL) y Paclitaxel (3, 9, 20 µg/mL) para realizar el estudio de exactitud (porcentaje de recuperación) y precisión, utilizando el protocolo de preparación de soluciones control como se indica a continuación:

Protocolo de preparación de soluciones control: en un frasco de vidrio introducir un papel filtro circular de diámetro 55 mm previamente humedecido con 200 µL del solvente de desorción (acetonitrilo:metanol:buffer pH 6 10:25:65 v/v), luego adicionar la alícuotas correspondientes de la soluciones estándar de Ifosfamida, Ciclofosfamida y Paclitaxel. Posteriormente, introducir un segundo filtro previamente humectado con 200 µL del solvente de desorción y completar a volumen (10 mL) con fase móvil (acetonitrilo:buffer pH 6 25:75 v/v), finalmente cerrar el frasco con la tapa. Sonicar la solución por diez minutos y filtrar el

sobrenadante con la ayuda de una jeringa de 10 mL y un filtro para jeringa adecuado que retenga partículas contaminantes. Una vez filtrada la solución sobrenadante, inyectar 20 µL en el cromatógrafo y proceder con el análisis de acuerdo con las condiciones cromatográficas establecidas en el punto N° 1.

8. Resultados de la exactitud y precisión del método

Exactitud del método expresada como porcentaje de recuperación para Ifosfamida

Concentración nominal (µg/mL)	Porcentaje de recuperación (%) ± desviación estándar
5	95.42 ± 7.49
10	95.85 ± 11.89
20	97.33 ± 2.61

n=15 (determinaciones realizadas en cinco días)

Exactitud del método expresada como porcentaje de recuperación para Ciclofosfamida

Concentración nominal (µg/mL)	Porcentaje de recuperación (%) ± desviación estándar
5	100.51 ± 14.77
10	97.98 ± 12.40
20	105.33 ± 6.85

n=15 (determinaciones realizadas en cinco días)

Exactitud del método expresada como porcentaje de recuperación para Paclitaxel

Concentración nominal (µg/mL)	Porcentaje de recuperación (%) ± desviación estándar
5	96.11 ± 5.38
10	98.16 ± 5.30
20	99.70 ± 9.34

n=15 (determinaciones realizadas en cinco días)

Repetibilidad y reproducibilidad del método expresada como desviación estándar relativa para Ifosfamida

Concentración nominal (µg/mL)	Intra-día* D.E.R. (%)	Inter-día** D.E.R. (%)
5	1.539	2.008
10	3.494	3.789
20	3.993	2.887

*n=3 (determinaciones realizadas en un día)

**n=15 (determinaciones realizadas en cinco días)

Repetibilidad y reproducibilidad del método expresada como desviación estándar relativa para Ciclofosfamida

Concentración nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-día* D.E.R. (%)	Inter-día** D.E.R. (%)
5	3.213	3.438
10	1.575	1.990
20	2.486	2.776

*n=3 (determinaciones realizadas en un día)

**n=15 (determinaciones realizadas en cinco días)

Repetibilidad y reproducibilidad del método expresada como desviación estándar relativa para Paclitaxel

Concentración nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-día* D.E.R. (%)	Inter-día** D.E.R. (%)
3	1.737	1.921
9	2.095	2.893
20	4.757	2.931

*n=3 (determinaciones realizadas en un día)

**n=15 (determinaciones realizadas en cinco días)

9. Protocolo de recolección de las muestras ambientales desde los sitios de preparación y administración de agentes citostáticos en recintos hospitalarios

Antes de partir al lugar de toma de muestras, debe asegurarse de llevar todo los implementos necesarios para realizar dicha acción dentro de una nevera lo suficientemente grande para trasportarlos (ver anexo I al final del documento). El analista debe ser acompañado por alguien que colabore en la toma de fotografías y apuntes de registro del proceso. Ambas personas deben vestir el equipamiento de protección personal adecuado antes de comenzar con la recolección de muestras.

Es importante recordar que las muestras contenidas en los filtros pueden almacenarse a temperatura ambiente, no siendo necesario mantener una cadena de frío para evitar la degradación de las mismas durante su transporte y almacenamiento. Por el contrario, cuando las muestras han sido procesadas y convertidas en solución, es necesario refrigerarlas para evitar el fenómeno antes descrito.

Una vez que se haya llegado al lugar de toma de muestras e identificado las superficies a muestrear dentro de las áreas de preparación y administración de los agentes citostáticos, se debe proceder de la siguiente manera:

Si la superficie a muestrear es regular y tiene un área superior a los 400 cm^2 , fijar una plantilla de papel (20 x 20 cm) sobre el área específica de donde se tomará la muestra (ver figura 1). Humedecer un papel filtro (55 mm de diámetro) con 200 μL del solvente de desorción (acetónitrilo:metanol:buffer pH 6 10:25:65 v/v), doblarlo en dos mitades y deslizarlo sobre el área contenida en el interior de la plantilla realizando movimientos lentos y uniformes. Luego,

deslice la otra mitad del filtro que no ha tocado la superficie en dirección perpendicular al primer movimiento (ver figura 2). Deposite el filtro dentro de un frasco de vidrio con tapa debidamente etiquetado. Repetir estos pasos con un segundo filtro sobre la misma superficie.



Figura 1 Posicionamiento de la plantilla de papel (20 x 20 cm) sobre una superficie regular dentro de la sala de preparación de medicamentos citostáticos previo a la toma de muestra.

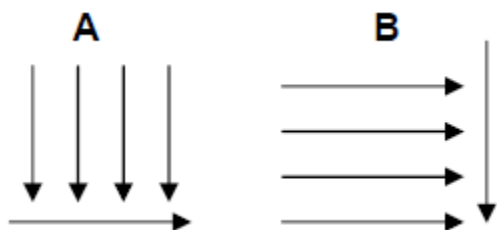


Figura 2 Desplazamiento y dirección secuencial del filtro durante la recolección de la muestra.

Si la superficie a muestrear es irregular, es necesario medirla y expresarla en unidad de área. En este caso no se fija ninguna plantilla de papel previo a la recolección. Humedecer un papel filtro (55 mm de diámetro) con 200 μ L del solvente de desorción (acetonitrilo:metanol:buffer pH 6 10:25:65 v/v), doblarlo en dos mitades y deslizarlo sobre el área de la cual se tomará la muestra, realizando movimientos lentos y uniformes. Luego, deslice la otra mitad del filtro que no ha tocado la superficie en dirección perpendicular al primer movimiento (ver figura 2). Deposite el filtro dentro de un frasco de vidrio con tapa debidamente etiquetado. Repetir estos pasos con un segundo filtro sobre la misma superficie.

Al finalizar el proceso de recolección de muestras, los frascos conteniendo los filtros con las muestras se reúnen y depositan dentro de la nevera, quedando listos para ser transportados al laboratorio para el análisis. Cada vez que se vaya a recolectar una nueva muestra, el analista debe cambiarse el par de guantes externo para evitar la contaminación cruzada entre las muestras.

10. Tratamiento y concentración de las muestras ambientales previo al análisis cromatográfico

Cuando las muestras se encuentren listas para ser analizadas, se deben adicionar 9.6 mL de fase móvil dentro de cada frasco que contiene los filtros para obtener un volumen final de 10 mL. Luego de este paso, sonicar los frascos por 10 minutos y filtrar la mayor cantidad posible de solución sonicada con la ayuda de una jeringa de 10 mL y un filtro para jeringa con tamaño de poro adecuado.

Posterior al paso del tratamiento de las muestras, es necesario concentrar las muestras para lograr la detección de los posibles analitos presentes en ellas, ya que éstos pueden encontrarse en concentraciones bajas que la técnica analítica pudiera no detectar. Para este propósito, se utilizan cartuchos de extracción en fase sólida que retienen a los analitos y eliminan impurezas indeseadas. De la solución previamente filtrada, adicione 2 mL sobre el cartucho previamente acondicionado con 3 mL de metanol y 3 mL de agua desionizada y elimine el solvente con la ayuda de un sistema de vacío. Luego, adicione 2 mL de acetato de etilo y reciba a los analitos de interés en un tubo de vidrio limpio y seco (ver figura 3). Evapore el acetato de etilo hasta sequedad mediante corriente de nitrógeno, introduciendo una punta de micropipeta adosado a la manguera que provee el nitrógeno (ver figura 4). Reconstituya el remanente del tubo con 200 μ L de fase móvil (acetonitrilo:buffer pH 6 25:75 v/v), agite el tubo e inyecte la nueva solución en el cromatógrafo para el análisis. Considere el factor de concentración presente (2/0.2 mL).



Figura 3 Extracción en fase sólida con sistema de vacío para la concentración de los analitos presentes en las muestras ambientales.

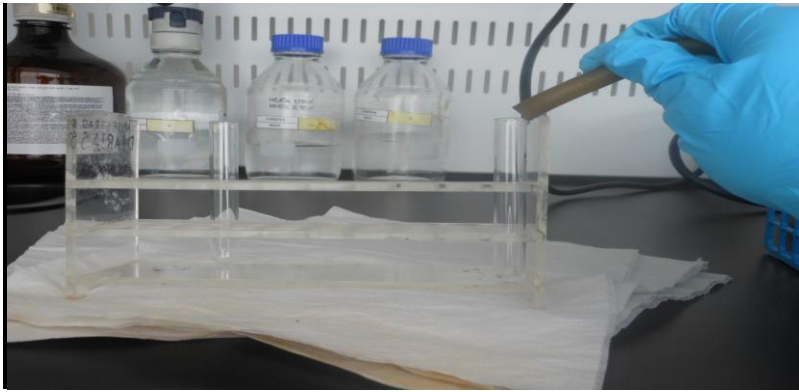


Figura 4 Evaporación total del solvente de elución mediante corriente de nitrógeno.

11. Manejo del material contaminado con agentes citostáticos

Todo material contaminado con agentes citostáticos dentro del laboratorio de análisis, en este caso con Ifosfamida, Ciclofosfamida y Paclitaxel, debe ser almacenado en un lugar especialmente destinado para ello, separado de la basura ordinaria e identificado claramente para que finalmente sea manipulado por personal de alguna empresa especializada en el manejo de residuos de sustancias peligrosas (medicamentos citostáticos). Generalmente se utilizan contenedores plásticos tapados de color rojo que indican la presencia de riesgo químico mediante algún dibujo (ver figura 5).



Figura 5 Contenedor plástico especial para el almacenamiento transitorio de materiales desechables contaminados con sustancias peligrosas (medicamentos citostáticos) en el laboratorio.

12. Limpieza y descontaminación de las estaciones de trabajo del laboratorio expuestas a los agentes citostáticos

Uno de los procedimientos más utilizados para la limpieza de zonas contaminadas con agentes citostáticos en centros hospitalarios donde se manipulan este tipo de medicamentos, y por lo tanto en laboratorios de análisis donde se realicen determinaciones de estas sustancias consta de la aplicación de una solución de hipoclorito de sodio al 2% en las superficies compatibles con este agente corrosivo u oxidante, la cual debe permanecer en contacto con la superficie contaminada al menos 30 segundos para permitir la desactivación química de la contaminación presente; luego de realizado este paso, se remueven los residuos de la contaminación con alcohol isopropílico al 70%. Para aquellas superficies incompatibles con

hipoclorito de sodio, solamente se debe aplicar la solución de alcohol isopropílico. Se deben utilizar toallas de papel desechables para evitar propagar la contaminación en la estación de trabajo. Otro aspecto fundamental en esta etapa está relacionado con el personal a cargo de ejecutarla. Toda persona que realice esta labor debe vestir los elementos de protección personal adecuados, incluyendo: doble par de guantes de protección, bata o traje de seguridad, lentes de seguridad y mascarilla con filtros orgánicos, especialmente cuando se está aplicando la solución de hipoclorito de sodio.

El protocolo de limpieza debe aplicarse cada vez que se han manipulado medicamentos citostáticos en los lugares que se han definido para ello (cabina de extracción de vapores, mesones, balanza analítica, etc.) una vez que se haya finalizado la jornada de trabajo.

Anexo I Materiales necesarios para la recolección de muestras ambientales en recintos hospitalarios donde se preparan y administran medicamentos citostáticos

- Nevera para transportar muestras y elementos de muestreo desde y hacia el laboratorio de análisis.
- Elementos de protección personal: guantes, bata o traje de seguridad, mascarilla (N95), gafas de seguridad. En la unidad de farmacia oncológica, adicionalmente se debe vestir gorro y polainas (cubre zapatos) para evitar introducir elementos contaminantes a la zona estéril de preparación.
- Plantillas o marcos de papel, 20 x 20 cm.
- Regla para efectuar mediciones.
- Cinta adhesiva.
- Filtros de papel 55 cm de diámetro.
- Solvente de desorción (acetonitrilo:metanol:buffer pH 6 10:25:65 v/v).
- Frascos tapados para la toma de muestras.
- Micropipeta de 200 μ L y puntas.
- Bolsa roja para almacenar el material contaminado con medicamentos citostáticos que se utilice durante la toma de muestras.
- Libreta y lápiz para registro de actividades.
- Cámara fotográfica.