

# Verifica del metodo monografico della United States Pharmacopeia con il sistema UV-Vis Agilent Cary 60

Quantificazione delle impurezze di ferro nel solfato di magnesio secondo la monografia USP



## **Autori**

Ciaran Worth, Wesam Alwan e  
Fabian Zieschang  
Agilent Technologies, Inc.

## **Abstract**

Questo studio illustra come lo spettrofotometro UV-Vis Agilent Cary 60 possa essere utilizzato per verificare la monografia della United States Pharmacopeia (USP) per la quantificazione delle impurezze di ferro nel solfato di magnesio. Il sistema Cary 60 è stato equipaggiato con un cambiacelle a 18 celle, che consente l'analisi automatizzata di bianchi, standard e campioni sotto il controllo del software Agilent Cary WinUV. Il metodo verificato è stato utilizzato per determinare il contenuto relativo di ferro in due campioni di solfato di magnesio, risultando al di sotto del limite specificato di 0,5 µg/g. I risultati confermano l'idoneità del sistema Cary 60 per applicazioni di controllo qualità in ambito farmaceutico.

## Introduzione

Le autorità governative, a livello nazionale e internazionale, regolano i prodotti farmaceutici per garantirne la sicurezza, l'efficacia, la qualità e l'etichettatura. Queste autorità pubblicano monografie farmaceutiche rivolte agli sviluppatori e ai produttori di farmaci, aiutandoli a mantenere standard qualitativi coerenti durante le fasi di ricerca, sviluppo e produzione. Le principali farmacopee, come la USP, la Farmacopea Europea (Ph. Eur.), la Farmacopea Britannica (BP), la Farmacopea Giapponese (JP) e la Farmacopea della Repubblica Popolare Cinese (ChP), pubblicano monografie farmaceutiche come parte dei loro compendi ufficiali. Le monografie forniscono metodi per la determinazione quantitativa delle sostanze farmaceutiche, compresa la misurazione delle impurezze entro limiti accettabili, e sono fondamentali per soddisfare i requisiti normativi. La spettroscopia UV-Vis è una tecnica comunemente indicata in diverse monografie farmaceutiche.

Secondo le buone pratiche di fabbricazione (GMP), qualsiasi tecnica utilizzata per analizzare sostanze farmaceutiche deve essere valutata per determinarne l'idoneità alle condizioni reali di utilizzo. La USP fornisce informazioni generali sulla verifica delle procedure compendiali nel Capitolo Generale <1226> Verification of Compendial Procedures, nonché indicazioni specifiche sulle tecniche spettroscopiche UV-Vis nel Capitolo Generale <857> Ultraviolet-Visible Spectroscopy.<sup>1,2</sup>

In una precedente nota applicativa, lo **spettrofotometro UV-Vis Cary 60** e il **software Cary WinUV** hanno eseguito le misurazioni richieste da molti dei test di verifica descritti nel capitolo USP <857>.<sup>3</sup> Questo studio fornisce un esempio di come il sistema UV-Vis Cary 60, dotato di un **cambiaccelle a 18 celle**, possa essere utilizzato per la verifica del metodo per la quantificazione del ferro nel solfato di magnesio secondo la monografia USP sul solfato di magnesio.<sup>4</sup>

## Sistema UV-Vis Cary 60

UV-Vis Cary 60 è un sistema UV-Vis flessibile, potente e affidabile, ideale per analisi di routine di una gamma di sostanze in laboratori farmaceutici (Figura 1). UV-Vis Cary 60 combina una raccolta dati di alta qualità con bassi costi di esercizio, principalmente grazie alla sua potente sorgente luminosa, ovvero la lampada allo xeno. La robustezza e l'affidabilità della lampada, come testimoniato dalla relativa **garanzia di 10 anni**, riducono i potenziali costi di sostituzione e rivalidazione, massimizzando il tempo di operatività dello strumento.

Il sistema UV-Vis Cary 60 è stato sottoposto ad audit indipendente per l'impatto ambientale e ha ricevuto l'**etichetta di responsabilità, coerenza e trasparenza (ACT, Accountability, Consistency, Transparency)**, verificata da My Green Lab. L'etichetta fornisce informazioni riguardo l'impatto ambientale del sistema UV-Vis Cary 60 durante l'intero ciclo di vita.

Il sistema UV-Vis Cary 60 migliora l'impatto ambientale dei laboratori senza ostacolare la produttività o il progresso scientifico.



**Figura 1.** Lo spettrofotometro UV-Vis Agilent Cary 60 include una garanzia di sostituzione di 10 anni per la lampada allo xeno.

## Condizioni sperimentali

### Reagenti

- **Acido cloridrico diluito (HCl):** 1 mL di HCl in 1.000 mL di acqua
- **Soluzione A:** 500 mg/mL di acetato di ammonio in acqua
- **Soluzione B:** 13,4 mg/mL di acido ascorbico in acqua
- **Reagente cromogeno:** 3,8 mg/mL di 3-(2-piridil)-5,6-di-(2-furil)-1,2,4-triazina-5',5"-disolfonato, sale disodico
- **Soluzione stock standard di ferro:** 1,0 µg/mL di ferro in HCl diluito

### Preparazione delle soluzioni di bianco, standard e campione

La monografia USP sul solfato di magnesio<sup>4</sup> descrive la quantificazione della massa relativa di ferro in un campione di solfato di magnesio, calcolata a partire da una retta di regressione ottenuta dall'analisi di tre soluzioni standard note mediante UV-Vis.

Tutte le parti in vetro sono state lavate con HCl diluito. Tre soluzioni standard sono state preparate trasferendo 2,0, 5,0 e 10,0 mL della soluzione stock standard di ferro in tre matracci tarati da 50 mL, diluendo poi ciascuno fino a 35 mL con HCl diluito. La soluzione di bianco è stata preparata trasferendo 35 mL di HCl diluito in un matraccio tarato da 50 mL. Tutte le soluzioni stock sono state preparate il giorno stesso dei test.

Due soluzioni campione sono state preparate trasferendo 10 g di solfato di magnesio (Numero CAS 7487-88-9) in un matraccio tarato da 50 mL e diluendo fino a 35 mL con HCl diluito. La concentrazione di ferro nelle soluzioni campione è stata determinata utilizzando la curva di calibrazione in matrice corrispondente.

**Tabella 1.** Standard utilizzati per il calcolo della massa relativa di ferro nel solfato di magnesio.

Cono di campionamento standard	Concentrazione di ferro (mg/L)	Massa di ferro nello standard (µg)
Standard 1	0,04	2
Standard 2	0,1	5
Standard 3	0,2	10

### Strumentazione

Il sistema UV-Vis Cary 60 è stato equipaggiato con un cambiacelle a 18 celle e controllato tramite il software Cary WinUV. Il cambiacelle può essere spostato automaticamente per posizionare ogni cuvetta, consentendo la misurazione automatizzata fino a 18 cuvette. Il cambiacelle ha quindi permesso di eseguire più standard, campioni e ripetizioni in modalità senza operatore, con un unico metodo, aumentando notevolmente la produttività.<sup>5</sup> Le misurazioni sono state effettuate con celle da 1 cm di lunghezza del percorso a temperatura ambiente.

Il software Cary WinUV Concentration è stato utilizzato per raccogliere le misurazioni di bianchi, standard e campioni mediante la creazione di un metodo Concentration. Il metodo ha eseguito automaticamente la sottrazione del bianco, determinato una curva della concentrazione e calcolato la concentrazione di ferro nei campioni. I parametri del metodo sono descritti nella Tabella 2.

**Tabella 2.** Parametri dell'applicazione Agilent Cary WinUV Concentration utilizzati per il metodo UV-Vis Agilent Cary 60.

Parametro	Impostazione
Lunghezza d'onda di analisi	594 nm*
Tempo per la media del segnale (SAT)	0,5 s
Larghezza di banda spettrale (SBW)	1,5
Numero di standard	3
Numero di campioni	2

\* Specificato nella monografia USP sul solfato di magnesio<sup>4</sup>

## Risultati e discussione

### Verifica del metodo

Il processo di verifica dei metodi UV-Vis, descritto nel capitolo USP <857><sup>2</sup>, prevede i seguenti requisiti:

**Accuratezza della misurazione:** l'accuratezza della misurazione può essere determinata attraverso studi di recupero utilizzando concentrazioni note dell'analita nella matrice richiesta.

L'accuratezza della misurazione del test per il ferro nel solfato di magnesio è stata determinata arricchendo tre campioni standard di solfato di magnesio, con concentrazione nominale di 0,1 mg/L, con 2, 4 e 6 mL di soluzioni standard di ferro a 0,2 µg/mL. La concentrazione di ferro è stata quindi calcolata raccogliendo sei misurazioni ripetute (repliche) e calcolando l'assorbanza media per ciascuna soluzione arricchita. Il recupero percentuale è stato calcolato usando l'Equazione 1.

#### Equazione 1.

$$\% \text{ di recupero} = \frac{C_1}{C_2} \times 100$$

In cui:

$C_1$  = concentrazione misurata

$C_2$  = concentrazione calcolata

I risultati di recupero, pari a  $100 \pm 6\%$  della concentrazione attesa di ferro nel solfato di magnesio (Tabella 3), rientrano nei limiti accettabili dell'80,0-120,0% stabiliti da USP <857> per il recupero medio nell'analisi delle impurezze.

**Tabella 3.** Analisi del recupero su tre campioni di solfato di magnesio arricchiti con uno standard di ferro (0,2 mg/L) a tre concentrazioni, utilizzando uno spettrofotometro UV-Vis Agilent Cary 60.

Campione per saggio di accuratezza sul solfato di magnesio	Conc. nominale (mg/L)	Volume dello standard arricchito (mL)	Conc. calcolata (mg/L)	Conc. misurata (mg/L)	Recupero (%)
1	0,100	2	0,1166	0,1104	94,6
2		4	0,1286	0,1218	94,8
3		6	0,1375	0,1403	102,0

**Precisione della misurazione:** la precisione, o ripetibilità, può essere valutata misurando la concentrazione di sei soluzioni campione preparate allo stesso modo alla concentrazione del 100% del saggio e determinando la RSD (deviazione standard relativa).

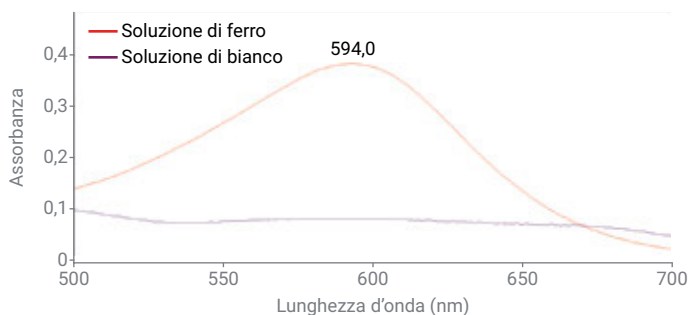
La precisione del test sul ferro nel solfato di magnesio è stata determinata suddividendo una soluzione standard con concentrazione nominale di 10 µg di ferro in 50 mL di matrice analitica in sei porzioni. Le assorbanze di queste sei porzioni, caricate nei cambiaccelle a 18 celle, sono state misurate a 594 nm utilizzando il sistema UV-Vis Cary 60. Utilizzando la funzione Sample Averaging del software WinUV Concentration, tutti e sei i campioni replicati sono stati misurati all'interno della stessa sessione. La ripetibilità delle misurazioni è stata valutata calcolando l'RSD della concentrazione misurata di ciascun campione. L'RSD è risultato pari all'1,8%, rientrando nel limite di non più del (NMT) 15,0-20,0% prescritto dalla USP <857>.

**Tabella 4.** Misurazioni di precisione del ferro in sei campioni replicati di solfato di magnesio.

Campione	Assorbanza	Concentrazione del campione (mg/L)
Campione 1-1	0,1864	0,1894
Campione 1-2	0,1884	0,1924
Campione 1-3	0,1929	0,1993
Campione 1-4	0,1898	0,1946
Campione 1-5	0,1881	0,1920
Campione 1-6	0,1875	0,1911
Deviazione standard (SD)	0,002276	0,00348
RSD %	1,205	1,802113

**Specificità:** la specificità può essere garantita dimostrando l'assenza di interferenze nell'intervallo spettrale tra la matrice del campione e quella dello standard.

Sono state eseguite scansioni in numero d'onda di una soluzione di bianco e di una soluzione standard di ferro con concentrazione nominale di 0,2 mg/L utilizzando il software Cary WinUV Scan. La Figura 2 mostra un confronto della risposta fotometrica del reagente cromogeno (3-(2-piridil)-5,6-di-(2-furil)-1,2,4-triazina-5',5"-disolfonato, sale disodico) in una soluzione contenente ferro rispetto alla stessa soluzione priva di ferro (soluzione di bianco) intorno al picco target a 594 nm. La soluzione di bianco non mostra risposta fotometrica nell'intervallo spettrale analizzato, indicando l'assenza di interferenze in questo intervallo.



**Figura 2.** Confronto delle scansioni in lunghezza d'onda tra un reagente cromogeno aggiunto a una soluzione contenente ferro e lo stesso reagente aggiunto a una soluzione di bianco (senza ferro).

**Limite di quantificazione (QL):** Il QL del ferro è stato stimato calcolando la deviazione standard (SD) di sei misurazioni ripetute di una soluzione di bianco e moltiplicando il valore per 10. Per questo test, il QL stimato è risultato pari a 0,00231 mg/L. Per confermare questo limite di quantificazione stimato, il rapporto segnale-rumore di questa misurazione al limite deve essere superiore a 10 e la misurazione a questa concentrazione deve risultare accurata e precisa. Inoltre, per essere considerato valido, il QL deve essere  $\leq$  50% del limite specificato nella monografia.

**Tabella 5.** Concentrazioni calcolate di sei misurazioni replicate di una soluzione di bianco e QL stimato del ferro.

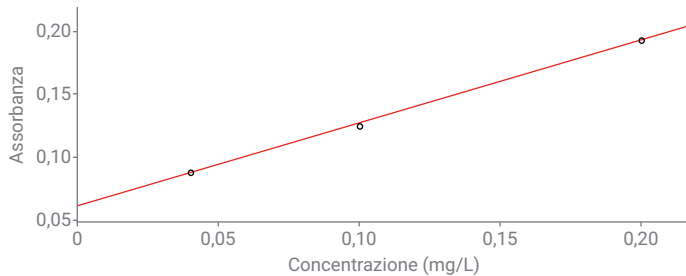
Replicato	Concentrazione (mg/L)
1	0,00776
2	0,0075
3	0,00776
4	0,00802
5	0,00762
6	0,00736
SD	0,000231
QL	0,002319

A seguito della verifica riuscita della procedura con UV-Vis Cary 60, l'analisi del ferro nel solfato di magnesio secondo la monografia USP può essere eseguita con sicurezza. La verifica conferma che lo strumento e i parametri sperimentali sono idonei alle condizioni reali di utilizzo.

**Misurazione del ferro nel solfato di magnesio:** per determinare la massa relativa di ferro nel solfato di magnesio, la monografia USP specifica che i valori di assorbanza di tre soluzioni standard di ferro preparate nella matrice analitica devono essere utilizzati per creare una curva di calibrazione. La massa relativa di ferro in un campione di solfato di magnesio può quindi essere determinata utilizzando l'Equazione 2.

Per preparare la matrice analitica, sono stati aggiunti 5 mL sia della Soluzione B che del reagente cromogeno a ciascuna delle soluzioni standard, campione e bianco (vedere la sezione Condizioni sperimentali). Ogni soluzione è stata quindi portata a volume (50 mL) con HCl diluito.

L'assorbanza di ciascuna soluzione standard è stata misurata rispetto alla soluzione di bianco e tracciata in funzione del contenuto di ferro, come mostrato nella Figura 3.



**Figura 3.** Curva di calibrazione basata sulla misurazione di tre soluzioni standard di ferro in matrice corrispondente con un UV-Vis Agilent Cary 60.

I valori di assorbanza di due soluzioni campione sono stati successivamente misurati e utilizzati per calcolare il contenuto di ferro relativo alla massa di solfato di magnesio, secondo l'Equazione 2.

**Equazione 2.**

$$\text{Risultato} = \frac{C}{W}$$

In cui:

C = contenuto di ferro nella soluzione di campione ( $\mu\text{g}$ )

W = peso del solfato di magnesio nella soluzione di campione

**Tabella 6.** Contenuto relativo di ferro in due campioni di solfato di magnesio.

Campione di solfato di magnesio	Contenuto di ferro ( $\mu\text{g}$ )	Risultato ( $\mu\text{g/g}$ )
Campione 1	3,1	0,31
Campione 2	2,5	0,25

I risultati relativi al ferro rientrano nei criteri di accettazione di NMT 0,5  $\mu\text{g/g}$ , che rappresenta il limite superiore specificato nella monografia USP.

## Conclusione

Un sistema UV-Vis Agilent Cary 60 dotato di cambiacelle a 18 celle è stato utilizzato per dimostrare che una procedura compendiale UV-Vis tratta da una monografia USP può essere verificata. Il software Agilent Cary WinUV e il cambiacelle a 18 celle hanno automatizzato le misurazioni replicate richieste dai test validazione USP, riducendo il carico di lavoro per l'operatore. I test di validazione hanno incluso la conferma della precisione, della specificità e dell'accuratezza della misurazione, nonché la determinazione del limite di quantificazione.

Dopo aver verificato il metodo, il sistema UV-Vis Cary 60 è stato utilizzato per misurare il contenuto di ferro in due campioni di solfato di magnesio secondo la procedura compendiale dell'USP per il solfato di magnesio. I risultati rientravano nei criteri di accettazione per tale materiale di < 0,5 µg/g.

Il sistema UV-Vis Cary 60 è adatto ai flussi di lavoro farmaceutici di assicurazione/controllo qualità (QA/QC) di routine e alle applicazioni di ricerca e sviluppo. È inoltre disponibile, come opzione, il software Agilent Cary WinUV Pharma, che supporta la conformità con la FDA 21 CFR Part 11 degli Stati Uniti, l'Allegato 11 dell'Unione Europea e le normative nazionali simili in materia di registrazioni elettroniche.

## Bibliografia

1. United States Pharmacopeia. General Chapter, <1226> Verification of Compendial Procedures. USP-NF. Rockville, MD: United States Pharmacopeia, **2024**. DOI: [https://doi.org/10.31003/USPNF\\_M870\\_03\\_01](https://doi.org/10.31003/USPNF_M870_03_01)
2. United States Pharmacopeia. General Chapter, <857> Ultraviolet-Visible Spectroscopy. USP-NF. Rockville, MD: United States Pharmacopeia, **2022**. DOI: [https://doi.org/10.31003/USPNF\\_M3209\\_03\\_01](https://doi.org/10.31003/USPNF_M3209_03_01)
3. Spectroscopy Solutions for Pharmaceuticals: Confidence in Compliance to USP <857> Using the Agilent Cary 60 UV-Vis Spectrophotometer, white paper di Agilent Technologies, numero di pubblicazione 5991-7269ITE, **2016**.
4. United States Pharmacopeia. USP Monographs, Magnesium Sulfate. USP-NF. Rockville, MD: United States Pharmacopeia, **2024**. DOI: [https://doi.usp.org/USPNF/USPNF\\_M47040\\_06\\_01.html](https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M47040_06_01.html)
5. Improved Lab Efficiency with the Agilent 18-Cell Changer Accessory, *Nota tecnica di Agilent Technologies*, numero di pubblicazione 5994-7250EN, **2024**.

## Ulteriori informazioni

- Spettrofotometro UV-Vis Cary 60
- Software Cary WinUV per applicazioni UV-Vis
- Domande frequenti sugli spettrofotometri e sulla spettroscopia UV-Vis

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

DE-001364

Le informazioni fornite possono essere soggette a modifica senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2024  
Stampato negli Stati Uniti, 12 novembre 2024  
5994-6929ITE