Nota applicativa

Analisi di disinfettanti per le mani con il sistema GC Agilent 8860 configurato con un rivelatore a ionizzazione di fiamma

Autore

Jie Zhang
Agilent Technologies, Inc.

Abstract

Questa nota applicativa descrive l'analisi di disinfettanti per le mani a base di etanolo e isopropanolo. Per ottimizzare la risoluzione cromatografica e la forma dei picchi è stata utilizzata la colonna Agilent J&W DB-WAX. Per la rivelazione è stato utilizzato un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID). Per la quantificazione in base alle indicazioni del metodo <611> della United States Pharmacopoeia (USP) è stato utilizzato uno standard di calibrazione interno (IS). La instrument suitability è stata analizzata in termini di fattore di scodamento dei picchi, risoluzione degli alcoli rispetto allo standard interno e ripetibilità della quantificazione.

Introduzione

Etanolo e alcol isopropilico (IPA) sono i principali componenti attivi nei disinfettanti per le mani. Per preservare l'efficacia, la concentrazione di etanolo o alcol isopropilico deve rimanere in un intervallo opportuno, in genere compreso tra 65 e 75% come recita l'etichetta del contenitore del disinfettante. Poiché nei prodotti disinfettanti possono essere presenti anche altri alcoli sotto forma di impurezze o aggiunte improprie ai fini di contraffazione dei prodotti, è importante eseguire la misura per verificare che gli alcoli corretti siano presenti agli adeguati livelli di concentrazione. La gascromatografia (GC) è una delle tecniche consigliate dalla United States Pharmacopoeia per la determinazione della concentrazione degli alcoli. La GC è anche in grado di fornire informazioni sui tempi di ritenzione per verificare l'identità degli alcoli e assicurare quindi che il disinfettante non sia stato contaminato. Grazie alla capacità di analisi quantitativa e qualitativa, la gascromatografia continuerà a svolgere un ruolo fondamentale nel controllo qualità dei disinfettanti per le mani.

I metodi per la determinazione degli alcoli, tra cui l'USP <611>[1] e l'ASTM D3695,[2] consigliano una colonna polare o mediamente polare per una separazione e risposta ottimali dei componenti alcolici. Un precedente lavoro[3] ha dimostrato che le colonne Agilent J&W DB-WAX o Agilent DB-624 Ultra Inert permettono di ottenere forme dei picchi più definite e più simmetriche per gli alcoli. Il rivelatore consigliato per la rivelazione degli alcoli è a ionizzazione di fiamma in considerazione della facilità d'uso e della capacità di generare una risposta stabile e adeguata nell'intervallo di concentrazione testato dopo la diluizione degli alcoli nel processo di preparazione del campione. In questo lavoro per l'analisi degli alcoli è stata impiegata una colonna DB-WAX Ultra Inert con un sistema GC Agilent 8860 in abbinamento a un rivelatore FID. Le prestazioni del sistema sono state valutate in termini di ripetibilità del tempo di ritenzione, risoluzione dei picchi, fattore di scodamento dei picchi e precisione della quantificazione. L'obiettivo consisteva nel dimostrare la system suitability del GC 8860/FID accoppiato a una colonna Agilent Ultra Inert per l'analisi degli alcoli nei disinfettanti per le mani.

Condizioni sperimentali

Il sistema GC Agilent 8860 è dotato di iniettore split/splitless e di rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID). L'iniezione dei campioni liquidi è stata eseguita con un campionatore automatico per liquidi Agilent (ALS) 7693A con siringa da 5 µL. I parametri analitici sono riportati nella Tabella 1.

Prodotti chimici e standard

I solventi alcolici e l'acetonitrile (IS) sono stati acquistati presso ANPEL Scientific Instrument (Shanghai). La soluzione di lavoro di glicerina è stata preparata per pesata di 58,4 mg di glicerina (circa 50 µL) e diluizione in acqua distillata fino a 1 mL. La concentrazione volumetrica calcolata della soluzione di lavoro di glicerina è risultata pari a 4,6% (v/v). Gli standard di calibrazione degli alcoli sono stati preparati per aggiunta di aliquote di alcoli puri o della rispettiva soluzione di lavoro ad acqua distillata fino a un volume finale di 1 mL. Etanolo, IPA e glicerina appartengono al gruppo 1 di soluzioni di calibrazione. L'intervallo di calibrazione per etanolo e IPA è compreso tra 1 e 4% (v/v). La concentrazione di glicerina è compresa tra 0,01 e 0,18% (v/v). Metanolo ed *n*-propanolo (n-PA) sono stati preparati nel gruppo 2 di soluzioni di calibrazione. L'intervallo di calibrazione per il metanolo era compreso tra 1 e 4% (v/v) e tra 0,1 e 1,5% (v/v) per l'*n*-propanolo. Lo standard interno (IS) acetonitrile (ACN) è stato aggiunto alle soluzioni di calibrazione a una concentrazione del 5% (v/v). Le soluzioni di calibrazione sono state preparate come mostrato nella Tabella 2. Il campione QC è stato preparato per diluizione di 25 µL di etanolo, 25 µL di IPA e 50 µL di acetonitrile fino a 1 mL in acqua distillata.

Il campione di gel disinfettante per le mani presentava una viscosità eccessiva per l'iniezione diretta ed è stato necessario diluirlo prima dell'iniezione con il campionatore automatico per liquidi 7693A. È per questa ragione che i campioni reali e gli standard di calibrazione sono preparati tramite diluizione in solvente. Il campione di 50 µL di disinfettante per le mani è stato erogato in un matraccio impiegando una siringa a tenuta di gas da 1 mL. In seguito sono stati aggiunti 50 µL di acetonitrile come IS e il campione è stato diluito a 1 mL con acqua distillata per la successiva analisi.

Tabella 1. Parametri analitici del sistema GC 8860-FID Agilent per standard di alcoli.

Parametri del sistema GC Agilent 8860	
Iniettore S/SL	250 °C, rapporto di splittaggio 20:1
Volume di iniezione	0,2 µL
Carrier gas	He
Velocità di flusso nella colonna	7 mL/min, modalità a flusso costante
Forno	50 °C (5 min), 30 °C/min fino a 230 °C (3 min)
FID	250 °C, aria: 400 mL/min, gas combustibile (H_2): 30 mL/min, make-up costante (N_2): 18 mL/min
Colonna	Agilent J&W DB-WAX UI, 30 m, 530 µm, 1 µm (codice 125-7032UI)
Liner per iniettore	Agilent Ultra Inert, a bassa caduta di pressione con lana di vetro (codice 5190- 2295)

Risultati e discussione

Questa nota applicativa è incentrata sull'analisi dei principali componenti alcolici e della possibile contaminazione da metanolo nei disinfettanti per le mani. Nello standard di calibrazione sono stati inclusi cinque tipi di alcoli. Si trattava di metanolo, etanolo, IPA, *n*-propanolo e glicerina. Tra questi, le concentrazioni di etanolo, IPA ed *n*-propanolo in genere sono riportate sull'etichetta in quanto sono strettamente correlate all'efficacia di eliminazione dei virus. La glicerina e altri tipi di alcoli possono essere rilevati in campioni reali, ma per questi alcoli i produttori in genere non riportano in etichetta la specifica concentrazione. L'inclusione della glicerina nello standard di calibrazione mira a dimostrare che il sistema qui descritto è in grado di generare un picco soddisfacente e un'adeguata rivelazione di alcoli viscosi e a eluizione tardiva come la glicerina.

La separazione di cinque alcoli e di uno standard interno in soluzione acquosa, con concentrazione dei componenti variabile tra 1,0 e 4% (v/v), è stata eseguita con la colonna DB-WAX Ultra Inert. Questo campione era una miscela dello standard di calibrazione di livello intermedio del gruppo 1 e del gruppo 2 con glicerina come standard di lavoro. Come mostrato nel cromatogramma (Figura 1) e in Tabella 3, i fattori di scodamento di tutti i picchi sono risultati inferiori a 1,2. L'eluizione di metanolo e IPA è avvenuta prima di quella dell'etanolo. La risoluzione dell'*n*-propanolo rispetto all'acetonitrile (IS) è risultata pari a 9, mentre quella dell'etanolo rispetto all'acetonitrile a 12. Lo standard USP <611> impone fattori di scodamento dei picchi degli alcoli inferiori a 2,0 e risoluzioni dei picchi rispetto allo standard interno superiori a 4,0. La risoluzione e la forma dei picchi ottenute con il sistema GC 8860, con il percorso del flusso che inizia dall'iniettore S/SL, attraversa la colonna analitica e termina in corrispondenza del rivelatore FID, hanno dimostrato che il sistema era idoneo all'analisi mirata degli alcoli.

La risoluzione di etanolo e IPA è risultata pari a 1,31. Non si tratta di una separazione alla linea di base ma ciò in genere non incide sulla quantificazione accurata di etanolo o IPA in considerazione del fatto che, nella maggior parte dei casi, questi due componenti non coesistono nello stesso disinfettante per le mani. Anche

Tabella 2. Preparazione degli standard di calibrazione degli alcoli.

N. livello	Standard di calibrazione gruppo uno			Standard di calibrazione gruppo due	
	Etanolo (µL)	IPA (µL)	Soluzione di lavoro di glicerina (µL)	Metanolo (µL)	*n*-propanolo (µL)
1	40 (4,0%)	10 (1,0%)	2 (0,0092%)	49 (4,9%)	1 (0,1%)
2	35 (3,5%)	15 (1,5%)	5 (0,023%)	45 (4,5%)	5 (0,5%)
3	30 (3,0%)	20 (2,0%)	10 (0,046%)	40 (4,0%)	10 (1,0%)
4	25 (2,5%)	25 (2,5%)	20 (0,092%)	35 (3,5%)	15 (1,5%)
5	20 (2,0%)	30 (3,0%)	40 (0,184%)	30 (3,0%)	NA
6	15 (1,5%)	35 (3,5%)	NA	25 (2,5%)	
7	10 (1,0%)	40 (4,0%)		20 (2,0%)	
8	NA	NA		15 (1,5%)	
9				10 (1,0%)	

Il volume finale di soluzione di calibrazione ai vari livelli è pari a 1 mL. Le concentrazioni degli alcoli ai vari livelli sono mostrate come valori tra parentesi.

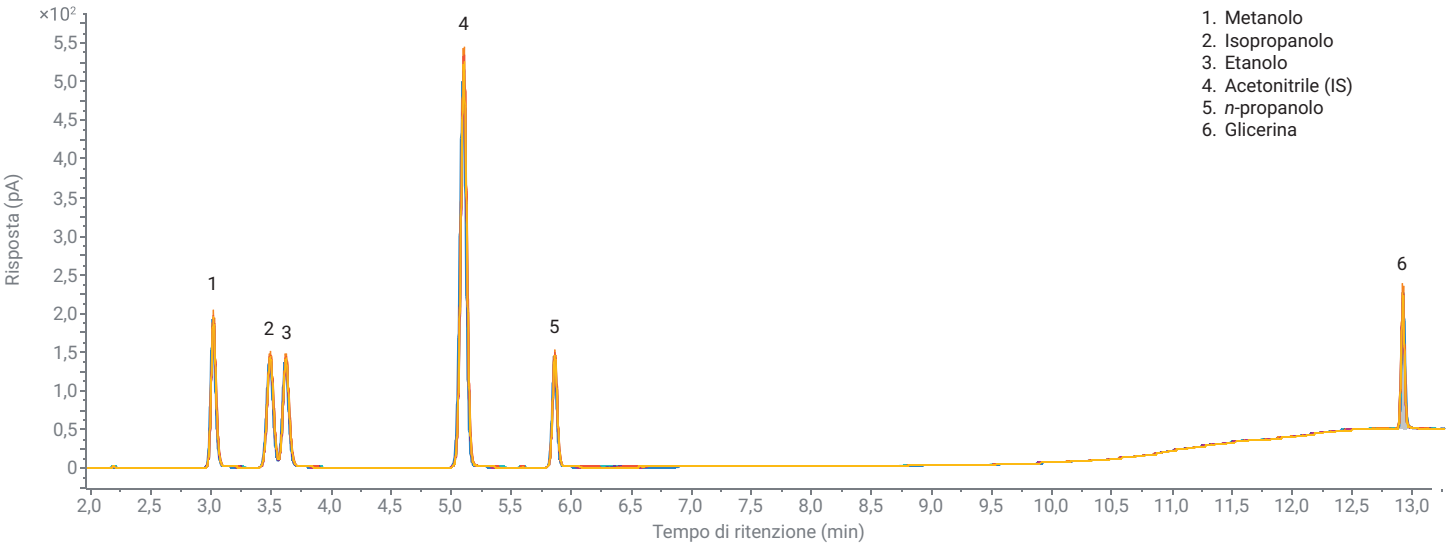


Figura 1. Sovrapposizione dei cromatogrammi di standard di alcoli analizzati con un sistema GC 8860-FID Agilent in cui è installata una colonna Agilent DB-WAX Ultra Inert.

qualora coesistessero, una risoluzione pari a 1,31 è sufficiente per fornire una quantificazione accurata per l'alcol principale, come indicato nel seguente risultato dell'analisi condotta su un campione di gel disinfettante per le mani.

Le curve di calibrazione degli alcoli sono state sviluppate con un metodo di calibrazione con standard interno. Come mostrato in Figura 2 e in Tabella 3, i coefficienti di correlazione (R^2) per gli alcoli sul rispettivo intervallo di calibrazione sono compresi tra 0,997 e 0,999.

La precisione della quantificazione è stata valutata tramite sette iniezioni di miscela di alcoli in cui ciascun alcol era presente in misura variabile dall'1 al 2% (v/v). I cromatogrammi sovrapposti sono mostrati nella Figura 1. Le precisioni della quantificazione sono state valutate in base alla deviazione standard relativa (RSD) del rapporto della risposta degli alcoli rispetto all'acetonitrile nel corso delle sette iniezioni. Nella maggior parte dei casi la precisione della quantificazione è risultata superiore a 1%, fatta eccezione per la glicerina che ha fatto registrare un valore RSD% pari a 1,7%. Lo standard USP <611> impone una RSD non superiore a 4,0% nel rapporto tra il picco dell'alcol e il picco dello standard interno. Le prestazioni della precisione sulla piattaforma oggetto del test superano il requisito USP <611>.

L'analisi degli alcoli è stata effettuata su due gel disinfettanti per le mani e su uno spray disinfettante di diversi fornitori. I cromatogrammi dei tre prodotti sono mostrati in Figura 3. I risultati dei test sugli alcoli principali in ciascun campione sono riportati nelle tabelle all'interno delle figure. Per il campione di gel disinfettante 1, i componenti identificati sono etanolo, *n*-propanolo e glicerina. Le concentrazioni testate di etanolo, *n*-propanolo e glicerina sono 61,0% (v/v), 10,4% (v/v) e 0,3% (v/v). Le concentrazioni riportate in etichetta dal produttore per etanolo ed *n*-propanolo erano comprese tra 54 e 66% (v/v) e tra 9 e 11% (v/v). La concentrazione misurata e quella in etichetta per il campione di gel 1 corrispondevano piuttosto bene tra loro.

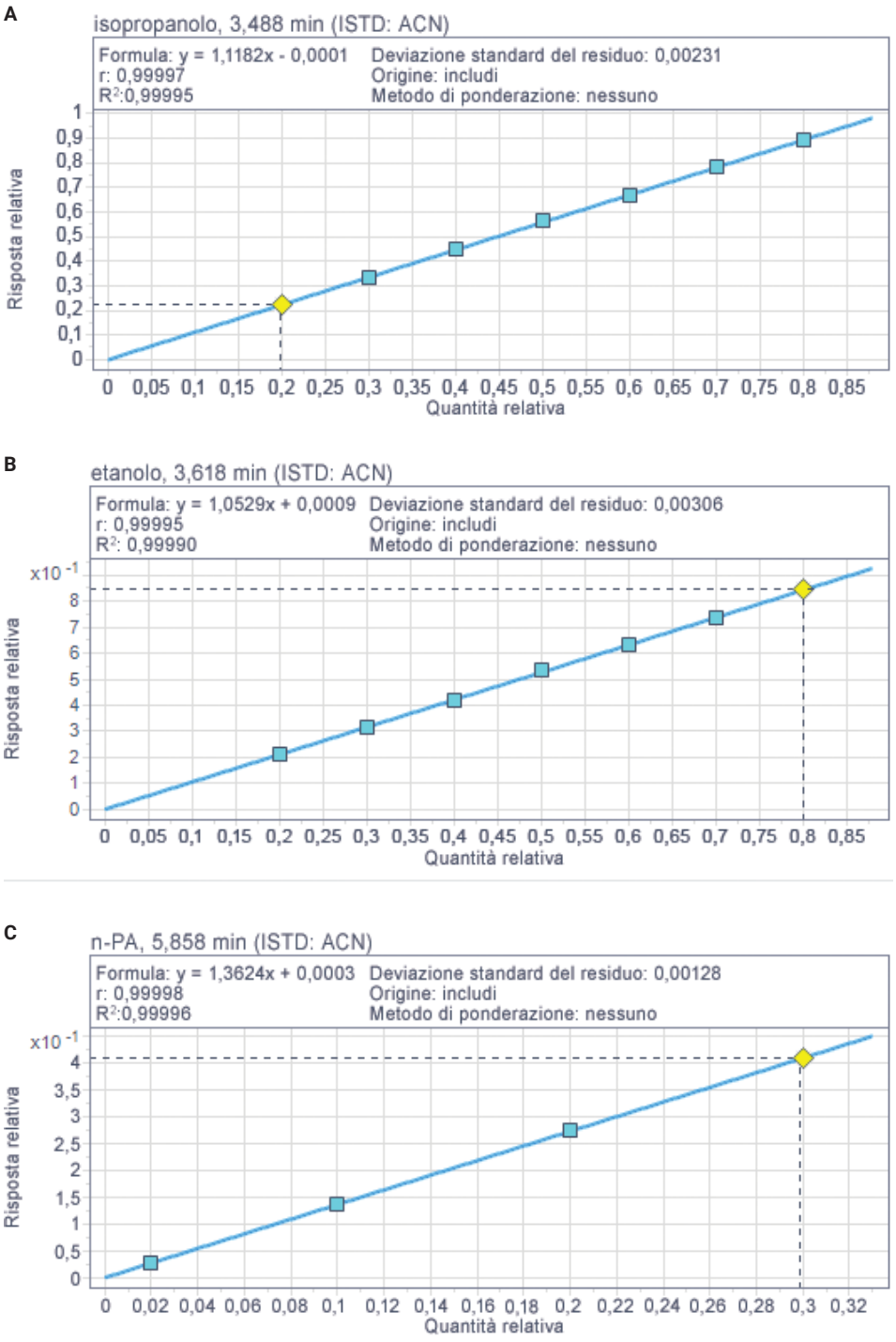
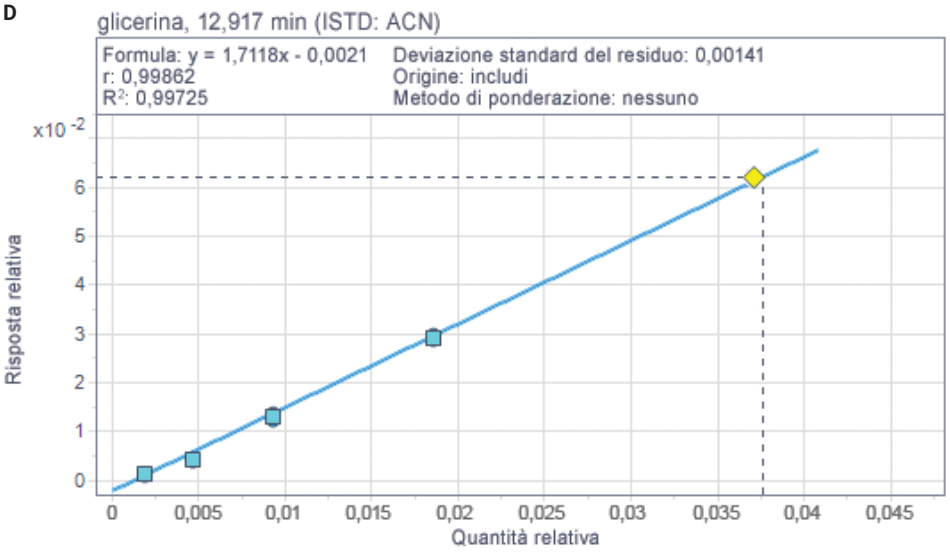


Figura 2A,B,C. Curve di calibrazione di IPA (A), etanolo (B) ed *n*-propanolo (C), con coefficienti di correlazione superiori a 0,999.

D



E

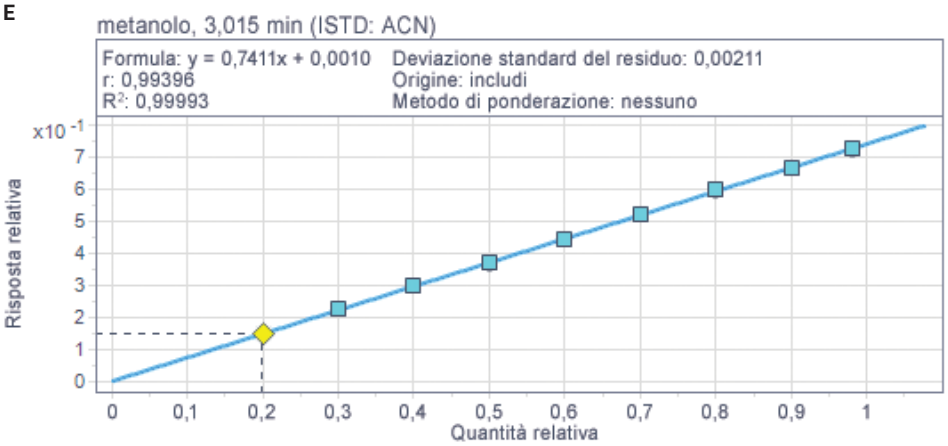


Figura 2D,E. Curve di calibrazione di glicerina (D) e metanolo (E), con coefficienti di correlazione superiori a 0,995.

Tabella 3. Dimostrazione della system suitability per l'analisi di alcoli.

Composto	RT medio (min)	RSD% RT	Precisione della quantificazione (%)	Coefficiente di correlazione della calibrazione	Intervallo di calibrazione (v/v)	Fattore di scodamento dei picchi	Risoluzione rispetto all'IS
Metanolo	3,015	0,025	0,3	0,9999	Tra 1 e 4,9%	1,2	>15
IPA	3,488	0,028	0,41	0,9999	Tra 1 e 4%	1,1	>15
Etanolo	3,618	0,026	0,16	0,9999	Tra 1 e 4%	1,0	15
n-propanolo	5,858	0,008	0,29	0,9999	Tra 0,1 e 1,5%	1,1	9
Glicerina	12,917	0,006	1,67	0,9970	Tra 0,0092 e 0,184%	1,0	>9

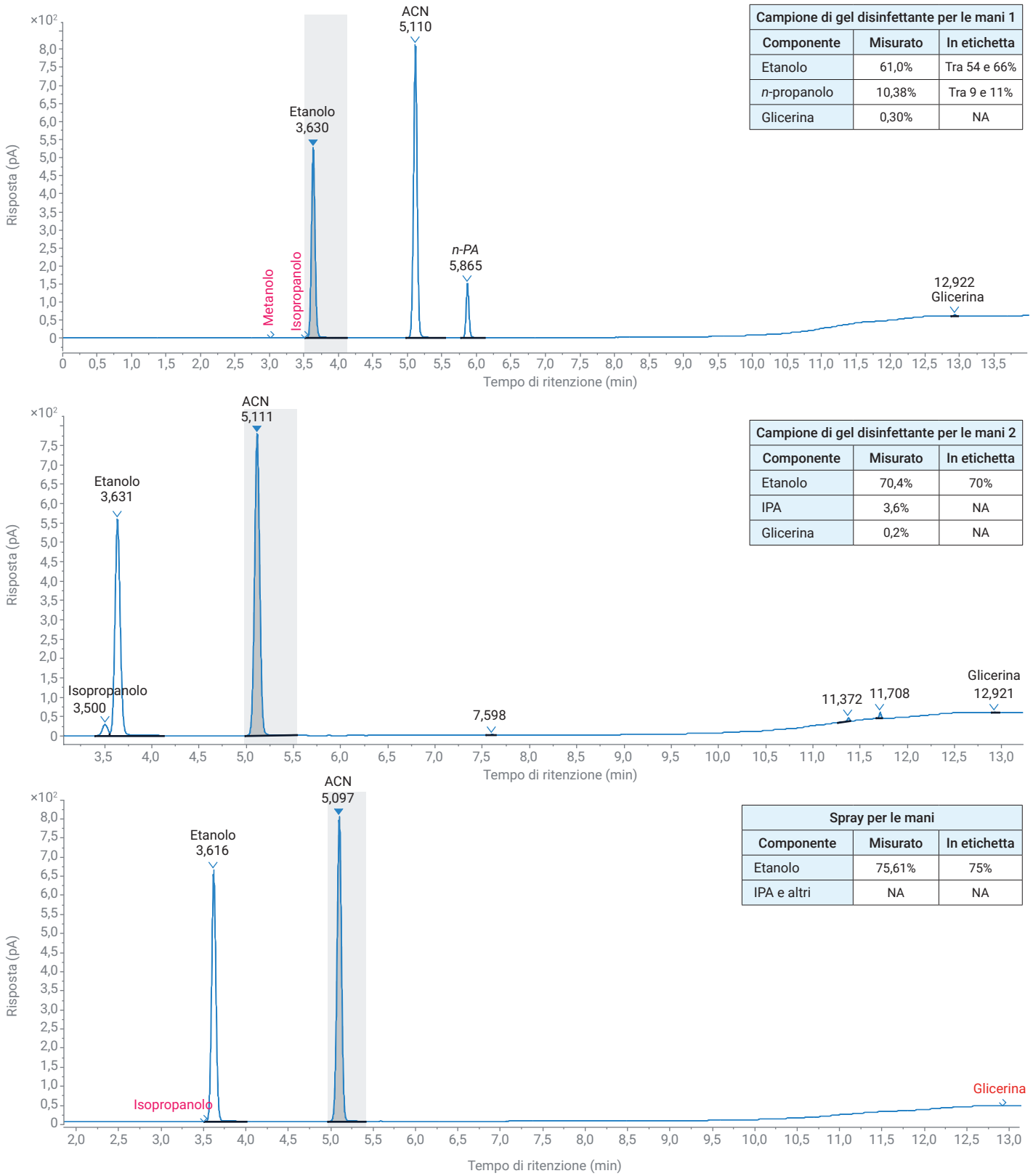


Figura 3. Cromatogrammi di spray e gel disinfettanti per le mani e rispettivi risultati dell'identificazione.

Per il campione di gel disinfettante 2, i componenti identificati sono etanolo 70,4% (v/v), IPA 3,6% (v/v) e glicerina 0,2% (v/v). L'etichetta riportava una concentrazione di etanolo del 70% (v/v), un valore che corrisponde bene ai risultati del test. Per il campione di gel 2, IPA ed etanolo non erano separati a livello della linea di base ma la quantificazione dell'etanolo è comunque accurata. La concentrazione di etanolo riportata in etichetta per lo spray alcolico è pari al 75% (v/v) e il valore misurato è 75,6%. Nello spray alcolico non è stata rilevata glicerina. Nel campione di gel disinfettante 2 sono stati rilevati altri picchi, che eluivano a 7,6, 11,4 e 11,7 minuti. È probabile che tali componenti siano aggiunti dai produttori al disinfettante come agenti antimicrobici o umettanti e così via. La rispettiva concentrazione è stata stimata a valori inferiori all'1% (v/v) utilizzando il fattore di risposta relativa della glicerina. Non è stato rilevato metanolo nei tre campioni di disinfettanti per le mani.

Per testare la stabilità del sistema è stata eseguita una sequenza lunga. Sono state effettuate un totale di 40 iniezioni di campioni di gel disinfettante per le mani e analizzati cinque campioni QC. La sequenza iniziava con un campione QC, seguito da cinque iniezioni di campione di gel disinfettante 1 e cinque iniezioni di campione di gel 2. Seguivano quindi altri tre cicli di un'iniezione di campione QC e 10 iniezioni di campioni reali, per finire con una quinta iniezione di campione QC. La concentrazione nominale di etanolo e IPA nel campione QC era pari a 50,0% (v/v). I cromatogrammi sovrapposti di cinque campioni QC sono mostrati in Figura 4. I risultati per RT e quantificazione dei cinque campioni QC sono elencati in Tabella 4. Le concentrazioni misurate medie di etanolo e IPA sono risultate pari a 50,2% (v/v) e 51,2% (v/v). L'accuratezza della quantificazione dei campioni QC è risultata pari a 101% e 102%. La precisione della quantificazione per IPA ed etanolo è risultata pari a 0,715% e 1,11%. Le ripetibilità degli RT sono risultate pari a 0,03% e 0,04%.

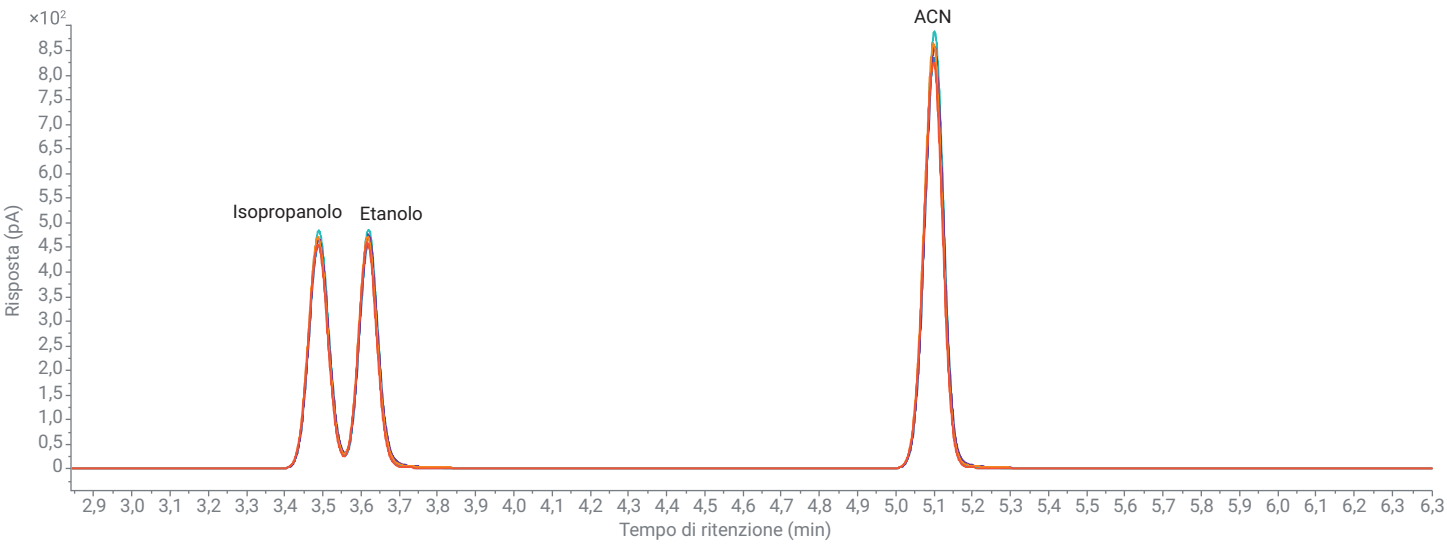


Figura 4. Cromatogrammi sovrapposti di cinque campioni QC.

Tabella 4. Precisione della quantificazione e dell'RT di cinque campioni QC nel corso di 40 analisi di campioni reali.

Quantificazione (vol%)	QC1	QC2	QC3	QC4	QC5	RSD% quan.
IPA	50,363	50,038	49,958	50,045	50,821	0,71%
Etanolo	50,544	51,061	52,067	51,473	51,051	1,11%
Tempo di ritenzione (min)	**QC1**	**QC2**	**QC3**	**QC4**	**QC5**	**RSD% RT**
IPA	3,487	3,488	3,488	3,486	3,486	0,03%
Etanolo	3,617	3,618	3,618	3,616	3,615	0,04%

Il riepilogo dei risultati per 20 iniezioni di campioni di gel 1 e 2 è riportato in Tabella 5. La concentrazione misurata per le 40 iniezioni di campioni reali di disinfettanti per le mani presentava una buona corrispondenza con gli intervalli di concentrazione riportati in etichetta. La precisione della quantificazione per etanolo ed *n*-propanolo nel campione 1 è risultata pari rispettivamente a 0,45% e 0,38%, mentre la precisione della quantificazione per IPA ed etanolo nel campione 2 è risultata pari a 0,55% e 0,31%. La ripetibilità degli RT per etanolo, IPA ed *n*-propanolo nel corso di 20 iniezioni è variata tra 0,02 e 0,04%, valori comparabili con l'RSD% degli RT compreso tra 0,01 e 0,03% ottenuto in sette iniezioni consecutive mostrate in Tabella 3. La precisione e accuratezza della quantificazione per campioni QC e campioni reali dimostrano che il sistema GC 8860-FID, accoppiato alla colonna DB-WAX Ultra Inert, consente di eseguire analisi di alcoli affidabili e accurate.

Tabella 5. Riepilogo dei risultati dei campioni di gel disinfettante nel corso del test di stabilità.

Gel 1					Gel 2				
N. iniezione	RT (min)	Quan. (vol%)	RT (min)	Quan. (vol%)	N. iniezione	RT (min)	Quan. (vol%)	RT (min)	Quan. (vol%)
	Etanolo		*n*-propanolo			IPA		Etanolo	
2	3,618	61,59	5,858	10,48	7	3,49	3,63	3,62	69,93
3	3,62	61,55	5,856	10,48	8	3,491	3,63	3,621	70,39
4	3,618	61,54	5,858	10,49	9	3,49	3,65	3,619	70,38
5	3,618	61,02	5,857	10,41	10	3,491	3,65	3,623	70,45
6	3,619	61,56	5,856	10,48	11	3,493	3,63	3,623	70,40
13	3,62	61,59	5,856	10,48	18	3,49	3,65	3,621	70,02
14	3,618	61,57	5,856	10,48	19	3,492	3,61	3,622	70,29
15	3,62	61,85	5,858	10,53	20	3,492	3,62	3,623	70,39
16	3,619	61,73	5,857	10,51	21	3,492	3,65	3,622	70,56
17	3,618	61,75	5,856	10,52	22	3,492	3,63	3,622	70,30
24	3,619	61,42	5,856	10,47	29	3,491	3,65	3,622	70,40
25	3,617	61,76	5,855	10,51	30	3,49	3,61	3,621	70,34
26	3,619	61,74	5,857	10,51	31	3,49	3,62	3,62	70,41
27	3,619	61,89	5,856	10,53	32	3,49	3,63	3,62	70,36
28	3,619	61,80	5,856	10,53	33	3,491	3,66	3,622	70,60
35	3,618	61,93	5,856	10,55	40	3,489	3,64	3,619	70,97
36	3,617	62,02	5,855	10,55	41	3,49	3,64	3,62	70,49
37	3,618	62,28	5,857	10,60	42	3,49	3,64	3,62	70,58
38	3,619	62,09	5,857	10,55	43	3,487	3,70	3,617	70,52
39	3,617	62,07	5,856	10,55	44	3,488	3,61	3,619	70,71
Media	3,62	61,74	5,86	10,51		3,49	3,64	3,62	70,42
RSD%	0,03%	0,45%	0,02%	0,38%		0,04%	0,55%	0,04%	0,31%

Conclusione

Questo lavoro ha utilizzato il sistema GC 8860 in abbinamento a un rivelatore FID e una colonna DB-WAX Ultra Inert per l'analisi degli alcoli in disinfettanti per le mani. Il percorso di flusso inerte del gas, reso possibile dal liner Ultra Inert e dalla colonna Ultra Inert, ha permesso di ottenere picchi definiti e simmetrici per gli alcoli target, con fattori di scodamento dei picchi inferiori a 1,2. La risoluzione dell'alcol rispetto allo standard interno ha superato il requisito previsto dal metodo USP <611>. La precisione media della quantificazione per gli alcoli volatili è risultata inferiore all'1%. Le prestazioni della calibrazione per tutti e cinque gli alcoli sono eccellenti, con coefficienti di correlazione lineare superiori a 0,995. L'analisi condotta su campioni reali di gel disinfettanti per le mani e spray disinfettanti ha prodotto risultati quantitativi accurati. Le prestazioni del sistema hanno dimostrato come il GC/FID 8860 abbinato alla colonna Ultra Inert sia utile per l'analisi degli alcoli in disinfettanti per le mani.

Bibliografia

1. USP <611> Alcohol Determination, Monograph US Pharmacopeia, **2020**.
2. ASTM D3695-95(2013), Standard Test Method for Volatile Alcohols in Water by Direct Aqueous-Injection Gas Chromatography, ASTM International, West Conshohocken, PA, **2013**.
3. Abercrombie, V. *et al.* Analysis of Ethanol and Isopropyl Alcohol in Alcohol-Based Hand Sanitizers by Direct Injection GC/FID, *nota applicativa Agilent Technologies*, codice pubblicazione 5994-1923EN.

www.agilent.com/chem

DE.5224768519

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2020

Stampato negli Stati Uniti, 29 giugno 2020
5994-2089ITE

Agilent
Trusted Answers