

Misure rapide, semplici e affidabili di campioni in soluzione tramite FTIR in trasmissione

Confronto tra il modulo DialPath e una cella per liquidi tradizionale nella quantificazione di simeticone con lo spettrometro FTIR Agilent Cary 630

Autori

Fabian Zieschang
Wesam Alwan
Agilent Technologies, Inc.



Introduzione

La spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FTIR) è una tecnica comunemente impiegata nel settore farmaceutico, area in cui gioca un ruolo importante nel controllo qualità dei prodotti farmaceutici finiti. Spesso tuttavia è difficile ottenere misure accurate e precise su campioni farmaceutici in soluzione se si impiega la FTIR in trasmissione con celle smontabili o celle a flusso. Un insieme di fattori rende complicato, soggetto a errori e dispendioso in termini di tempo l'uso di queste celle per l'analisi in fase liquida:

- Le celle sono fragili e può essere difficile assemblare distanziatori e finestrelle.
- Il design delle celle è di ostacolo alla riproducibilità della lunghezza del percorso.
- Le celle sono soggette a perdite.
- La presenza di bolle d'aria può interferire con l'analisi.
- La pulizia e l'assemblaggio delle celle sono attività dai tempi lunghi.
- Le misure su campioni aderenti e viscosi sono difficili.
- Sono necessari quantitativi ingenti di volume di campione e solvente di lavaggio.

L'esclusivo modulo di campionamento Agilent DialPath per lo spettrometro FTIR Agilent Cary 630 elimina la necessità di usare le tradizionali celle a flusso o smontabili per liquidi, semplificando pertanto l'analisi dei campioni in soluzione. Come illustrato nelle figure 1 (al centro) e 2, una gocciolina di campione in soluzione viene collocata tra due finestrelle disposte orizzontalmente del modulo DialPath. La distanza tra le due finestrelle determina la lunghezza del percorso ottico.



Figura 1. Analisi di campioni in soluzione in tre semplici passaggi con uno spettrometro FTIR Agilent Cary 630 dotato di modulo DialPath.

Il modulo DialPath permette di selezionare istantaneamente tre diverse lunghezze preimpostate del percorso con una semplice rotazione della testa del modulo stesso. Il modulo Agilent Tumbler, che impiega la stessa tecnologia del modulo DialPath, possiede una sola lunghezza del percorso anziché tre. Entrambi i moduli sono allineati in maniera permanente e possono essere fissati facilmente al lato anteriore del motore per FTIR Cary 630. Il software MicroLab Agilent rileva automaticamente qual è il modulo installato sul motore per FTIR Cary 630 e applica le impostazioni corrette, cosicché anche gli utenti alle prime armi possono scambiare i moduli in pochi secondi.

In questo studio è stato utilizzato un motore per FTIR Cary 630 dotato di modulo DialPath per la quantificazione del simeticone in un antiacido disponibile in commercio. A fini di confronto, i dati sono stati acquisiti anche adottando l'approccio FTIR tradizionale con una cella smontabile in un vano per i campioni in trasmissione. La quantificazione del simeticone è descritta nella monografia USP-NF, USP43-NF38, pagina 4044 (1). Secondo quanto riportato nella monografia, la quantità di simeticone in una formulazione farmaceutica è determinata dalla concentrazione percentuale del campione rispetto a una soluzione standard di simeticone a 2 mg/mL (2 mg/mL equivalgono a una concentrazione percentuale del 100%).

Condizioni sperimentali

Preparazione delle soluzioni di bianco, standard e dei campioni di controllo

La monografia USP43-NF38 descrive la quantificazione del simeticone in termini di concentrazione percentuale rispetto a uno standard noto di simeticone. Una soluzione standard di simeticone a 2 mg/mL (100%) è stata preparata utilizzando uno standard di riferimento USP di simeticone. Circa 25 mg di simeticone USP (CAS 8050-81-5) sono stati pesati accuratamente e trasferiti in un tubo di vetro per centrifuga da 50 mL con tappo a vite. Al tubo sono stati aggiunti 12,5 mL di toluene di grado spettroscopico seguiti da 25 mL di HCl 4,8 M. Il tubo è stato agitato manualmente per 5 minuti e quindi per altri 5 minuti in un miscelatore vortex. Nel passaggio successivo il tubo è stato centrifugato a 1500 rpm per 30 minuti. Circa 5 mL dello strato organico superiore sono stati trasferiti in un tubo per centrifuga da 50 mL con tappo a vite contenente circa 1 g di solfato di sodio anidro per rimuovere dallo strato organico gli eventuali residui di acqua. Il tubo è stato agitato energicamente a mano per 1 minuto e centrifugato per 10 minuti fino a ottenere uno strato trasparente. Il bianco è stato preparato con la medesima procedura senza però l'aggiunta di simeticone USP. Per testare il metodo con campioni a concentrazione alta, bassa ed entro l'intervallo sono stati preparati anche tre campioni di controllo contenenti simeticone in concentrazioni percentuali pari a 81,2, 114,0 e 100,7%.

Preparazione di capsule contenenti simeticone

Un tipo di capsule disponibili in commercio è stato acquistato presso una farmacia di zona. Il foglietto illustrativo riportava un quantitativo di 100 mg di simeticone per capsula. Ciascuna capsula è stata disciolta in 100 mL di HCl 4,8 M e in 50 mL di toluene per ottenere una soluzione a concentrazione nominale di 2 mg/mL (concentrazione percentuale del 100%). L'estrazione è stata eseguita con la stessa procedura adottata per la soluzione standard di simeticone.



Figura 2. Il campione in soluzione viene collocato sulla finestrella del campione del modulo DialPath installato sullo spettrometro FTIR Agilent Cary 630.

Strumentazione

In questo studio sono stati utilizzati due spettrometri FTIR Agilent Cary 630. Il primo FTIR Cary 630 era dotato di modulo di trasmissione progettato per una cella per liquidi smontabile tradizionale con finestrelle in fluoruro di calcio e distanziatore da 500 micron (Omni-cell, Specac Ltd., Regno Unito). Il secondo FTIR Cary 630 era dotato di modulo Agilent DialPath con lunghezza del percorso di 500 micron (Figura 2).

I campioni sono stati suddivisi in due lotti per l'analisi in parallelo con i due spettrometri FTIR utilizzando la cella per liquidi e il modulo DialPath. Per ridurre al minimo eventuali residui o l'effetto memoria tra campioni successivi, la cella per liquidi è stata lavata con ingenti quantitativi di toluene. Per la pulizia delle due finestrelle dei campioni del modulo DialPath è stato sufficiente un panno cui sono state applicate poche gocce di isopropanolo. È stato utilizzato il software MicroLab per raccogliere i dati e creare un metodo per il calcolo diretto della concentrazione del campione. Per compensare l'assorbanza dei solventi del campione, il fondo è stato misurato rispetto al bianco sia nella cella per liquidi sia sul modulo DialPath. In Tabella 1 è riportato un riepilogo dei parametri di raccolta dati.

Tabella 1. Parametri della raccolta dati FTIR usati per le misure quantitative con la cella per liquidi tradizionale e con il modulo DialPath.

Parametro	Impostazione
Intervallo spettrale (cm ⁻¹)	Tra 4000 e 650
Scansioni del fondo	64
Scansioni del campione	64
Risoluzione spettrale (cm ⁻¹)	2
Raccolta del fondo	È stato usato un bianco
Lunghezza del percorso (micron)	500*

*Come specificato in USP43-NF38

Risultati e discussione

Analisi quantitativa: confronto tra cella di trasmissione smontabile tradizionale e DialPath

L'analisi quantitativa dei campioni di simeticone è stata effettuata con i due spettrometri FTIR Cary 630, uno con una cella per liquidi smontabile tradizionale e uno con un modulo DialPath. Per la quantificazione è stata usata l'assorbanza massima della banda a circa 1260 cm⁻¹. Secondo quanto riportato nella monografia USP43-NF38, è possibile utilizzare i valori di assorbanza dello standard e dei campioni per calcolare la concentrazione percentuale del simeticone mediante l'equazione 1 (1):

Equazione 1:

$$\text{Concentrazione percentuale} = \frac{A_U}{A_S} \cdot \frac{C_S}{C_U} \cdot 100\%$$

Nel dettaglio:

$$\text{Concentrazione percentuale} = A_U \cdot \frac{1}{A_S} \cdot \frac{C_S}{C_U} \cdot 100\% \equiv A_U \cdot \left(\frac{1}{A_S} \cdot \frac{C_S}{C_U} \cdot 100\% \right)$$

$\equiv A_U \cdot (\text{fattore moltiplicativo})$

A_U = assorbanza della soluzione di campione

A_S = assorbanza della soluzione standard

C_S = concentrazione di simeticone nella soluzione standard

C_U = concentrazione nominale di simeticone nella soluzione di campione

Calcolo automatico della concentrazione percentuale

Il software MicroLab accompagna gli utenti per l'intero flusso di lavoro delle analisi con immagini esplicative e un design di facile navigazione. Nel software MicroLab sono stati creati entrambi i metodi FTIR per l'analisi di routine di soluzioni di simeticone con DialPath e con la cella per liquidi. I metodi determinano automaticamente l'assorbanza massima a ~1260 cm⁻¹ (utilizzando l'altezza del picco con una componente a linea di base singola) e il software esegue automaticamente il calcolo in base all'equazione 1 (vedere Figura 3).

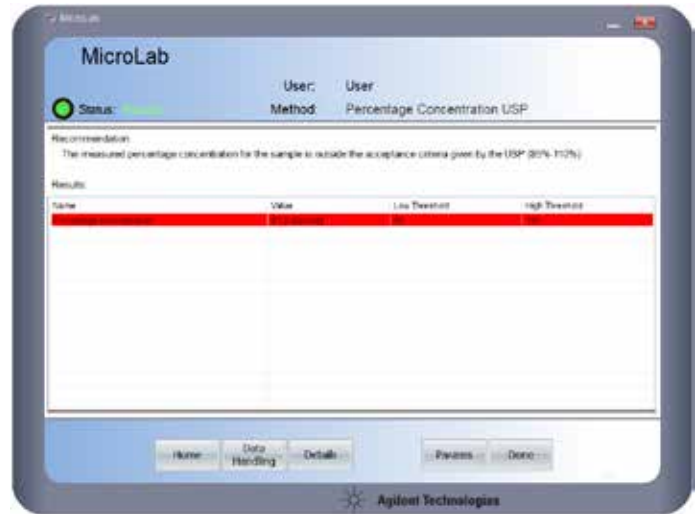
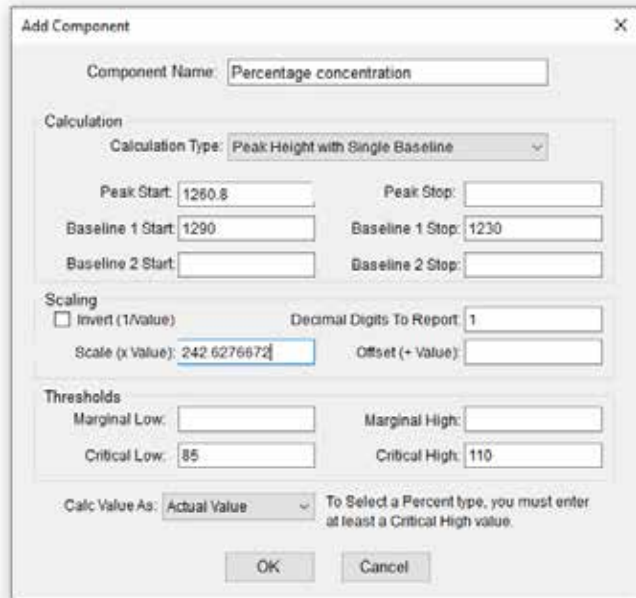


Figura 4. Il software MicroLab è stato utilizzato per determinare la concentrazione percentuale dei campioni di controllo e delle capsule disponibili in commercio. Subito dopo l’acquisizione dei dati vengono riportati risultati processabili con codice a colori, in linea con le impostazioni di soglia del metodo.

Figura 3. Il software MicroLab impiega “componenti” per calcolare i risultati quantitativi a partire dagli spettri misurati. La componente mostrata in alto determina automaticamente il valore di assorbanza (A_{λ}) in corrispondenza del massimo della banda ossia, in questo esempio, a circa 1260,8 cm^{-1} . La scala (valore x) applica quindi al valore di assorbanza un fattore moltiplicativo per fornire il risultato finale: Concentrazione percentuale = valore di assorbanza (A_{λ}) x fattore moltiplicativo, come descritto nell’equazione 1. In questo studio il fattore moltiplicativo per DialPath è 242,6276672.

La concentrazione percentuale di simeticone in un campione viene riportata subito dopo l’acquisizione dei dati. Gli eventuali risultati che non rientrano nell’intervallo 85-110% dei criteri di accettazione delle specifiche USP sono contrassegnati in rosso, come mostrato in Figura 4 per il campione di controllo 1 che contiene l’81,2% di simeticone.

Tabella 2. Concentrazione percentuale di simeticone nei tre campioni di controllo misurati mediante uno spettrometro FTIR Cary 630 con DialPath e uno spettrometro FTIR Cary 630 con cella di trasmissione.

Campione di controllo	Concentrazione percentuale teorica (%) di simeticone	FTIR Cary 630 con DialPath		FTIR Cary 630 con cella di trasmissione	
		Concentrazione percentuale misurata (%)	Accuratezza (%)	Concentrazione percentuale misurata (%)	Accuratezza (%)
1	81,2	81,2	100	80,3	98,8
2	114,0	113,1	99,2	111,1	97,4
3	100,7	102,6	98,1	103,1	97,7

Le concentrazioni percentuali di simeticone nelle capsule disponibili in commercio misurate dai due strumenti FTIR Cary 630 con modulo DialPath e con la cella per liquidi rientrano nell'intervallo accettabile 85,0-110,0% previsto dalle specifiche USP (Tabella 3) (7). I risultati suggeriscono che l'uso del modulo DialPath costituisce una tecnica di campionamento adeguata per la determinazione delle concentrazioni percentuali di simeticone in formulazioni farmaceutiche liquide in conformità ai requisiti USP.

Tabella 3. Concentrazioni percentuali di capsule di simeticone disponibili in commercio ottenute mediante FTIR con un modulo DialPath e una cella di trasmissione.

	Concentrazione percentuale (%) misurata con DialPath	Concentrazione percentuale (%) misurata con cella di trasmissione
Campione commerciale 1	101,3	103,8
Campione commerciale 2	101,7	101,8
Campione commerciale 3	102,4	102,6

Le prestazioni dello spettrometro FTIR Cary 630 con il modulo DialPath sono state valutate anche in termini di accuratezza, precisione, linearità e intervallo di concentrazione.

Accuratezza di misura

Per verificare l'accuratezza delle misure DialPath è stato eseguito un test basato su aggiunta di standard. A tre aliquote di un campione avente una concentrazione percentuale nominale di simeticone pari a 97,3% è stato addizionato simeticone 5, 10 e 15% aggiungendo volumi accurati di una soluzione standard di simeticone ad alta concentrazione. Ciascun campione arricchito è stato misurato tre volte e il recupero medio è stato calcolato mediante la seguente equazione:

$$\text{Equazione 2: Recupero \%} = (C_1/C_2) \times 100$$

C_1 = concentrazione percentuale misurata

C_2 = concentrazione percentuale calcolata

Come riportato in Tabella 4, tutti i risultati del recupero rientrano nel 100,5%; ciò suggerisce che l'uso di uno spettrometro FTIR Cary 630 dotato di modulo DialPath consente di eseguire misure con elevata accuratezza.

Tabella 4. Analisi di un campione di simeticone a cui è stato aggiunto simeticone a tre diverse concentrazioni percentuali; l'analisi è stata eseguita con uno spettrometro FTIR Cary 630 dotato di modulo DialPath per determinare l'accuratezza del metodo, n=3.

Concentrazione percentuale del campione (%)	Concentrazione percentuale dell'aggiunta (%)	Concentrazione percentuale calcolata (%)	Concentrazione percentuale misurata (%)	Recupero medio (%)
97,3	5,0	102,3	102,4	100,1 ± 0,2
97,3	10,0	107,3	107,8	100,5 ± 0,4
97,3	15,0	112,3	112,7	100,4 ± 0,1

Precisione di misura

La precisione delle misure eseguite con lo spettrometro FTIR Cary 630 con modulo DialPath è stata valutata effettuando uno studio di ripetibilità. Una soluzione di simeticone è stata suddivisa in sei frazioni, ciascuna delle quali è stata analizzata separatamente. La ripetibilità dei risultati è stata valutata calcolando la media e la deviazione standard dell'assorbanza e della concentrazione percentuale di simeticone (Tabella 5). Lo spettrometro FTIR Cary 630 con il modulo DialPath ha evidenziato una precisione eccellente, con un valore di deviazione standard pari a solo 0,0013 per l'assorbanza e a 0,34% per le misure di concentrazione.

Tabella 5. Studio di ripetibilità sullo spettrometro FTIR Cary 630 con DialPath su sei misure dello stesso campione.

	Assorbanza	Concentrazione percentuale del campione (%)
Frazione 1 del campione	0,4154	100,8
Frazione 2 del campione	0,4144	100,5
Frazione 3 del campione	0,4137	100,4
Frazione 4 del campione	0,4167	101,1
Frazione 5 del campione	0,4158	100,9
Frazione 6 del campione	0,4178	101,4
Media	0,4156	100,9
Deviazione standard	0,0013	0,34

Linearità della calibrazione e intervallo di concentrazione

La linearità tra la concentrazione di analita e la lettura di assorbanza con il modulo DialPath è stata verificata creando una curva di calibrazione e valutando la curva tramite regressione dei minimi quadrati. Mediante opportune diluizioni sono stati preparati standard di calibrazione per cinque diverse concentrazioni di simeticone nell'intervallo di concentrazione percentuale 0-190%. Per valutare la linearità della risposta spettrale del modulo DialPath è stata impiegata l'altezza del picco corrispondente al simeticone ($1260,8 \text{ cm}^{-1}$). Tali misure sono state usate per ottenere la curva di calibrazione oltre che per il calcolo del coefficiente di correlazione (R^2) dalla curva di calibrazione. È stata creata la curva di calibrazione e tutti i calcoli statistici sono stati eseguiti con il software MicroLab Quant.

Il grafico dell'altezza del picco del simeticone (a $1260,8 \text{ cm}^{-1}$) in funzione della concentrazione indica che la risposta spettrale DialPath presenta un'eccellente linearità con un coefficiente di correlazione $R^2 = 0,9997$ (Figura 5).



Figura 5. Valutazione della linearità del modulo DialPath con il software MicroLab Quant. Il software calcola automaticamente curve di calibrazione e coefficienti di correlazione. Gli utenti possono referentare i risultati ottenuti a fini di documentazione.

Capacità di analisi dei campioni e uso di risorse

La quantificazione del simeticone impiegando lo spettrometro FTIR Cary 630 con modulo DialPath incrementa significativamente la capacità di analisi dei campioni, riduce al minimo il volume di campione e contiene lo spreco di solvente rispetto all'analisi con cella di trasmissione per liquidi (vedere Figura 6).

Con un tempo di analisi di un'ora, il modulo DialPath ha permesso l'analisi di 40 estratti di campione, il doppio rispetto alla cella per liquidi. Il tempo di acquisizione dei dati è risultato pari a 1 min circa per entrambe le tecniche di campionamento. DialPath, inoltre, ha richiesto l'uso di soli 20 μL di soluzione di un campione di simeticone, mentre la cella per liquidi ha richiesto 5 mL di ciascun campione.

Per evitare l'effetto memoria la cella per liquidi deve essere sottoposta a lavaggio più volte prima dell'iniezione del campione successivo. Il modulo DialPath può essere pulito con un panno e poche gocce di solvente, cosa che riduce lo spreco di solvente e permette di risparmiare sui costi di solvente e smaltimento dei rifiuti. La tecnica di campionamento DialPath è semplice e facile da usare ed evita la complessità associata alle celle di trasmissione per liquidi (per esempio pulizia dopo l'introduzione di ogni campione, necessità di evitare l'intrappolamento di bolle di gas e adeguata manipolazione delle piastre di apertura). DialPath permette di realizzare ingenti risparmi in termini di costi, tempi e campioni.

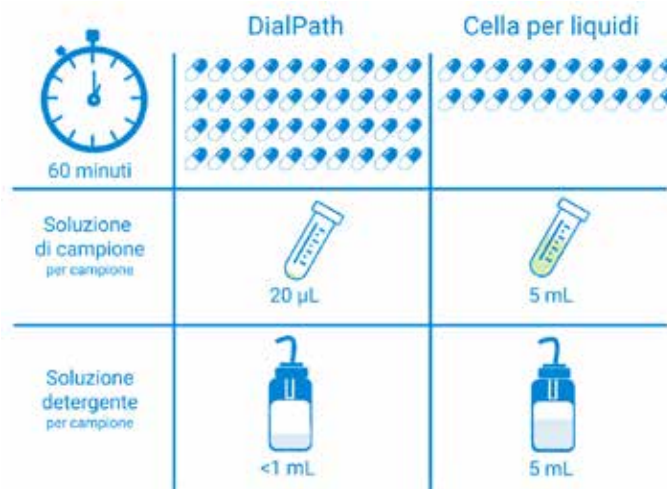


Figura 6. Punteggio di confronto dopo 60 min di analisi di estratti di simeticone mediante spettrometro FTIR Cary 630 con modulo DialPath e spettrometro FTIR Cary 630 con una cella di trasmissione per liquidi tradizionale.

Conclusione

Questa nota applicativa descrive l'uso dello spettrometro FTIR Cary 630 dotato di accessorio di campionamento ad alta efficienza (DialPath) per l'analisi quantitativa rapida di campioni farmaceutici in soluzione.

Le prestazioni, la velocità di analisi e l'innovativa tecnica di campionamento dello spettrometro FTIR Agilent Cary 630 con modulo DialPath hanno permesso di sviluppare e implementare rapidamente un metodo quantitativo per la misura del simeticone.

La qualità dei dati quantitativi generati dal FTIR Cary 630 con DialPath è risultata analoga o superiore ai risultati ottenuti mediante uno strumento FTIR Cary 630 con una cella tradizionale. La facilità d'uso del modulo DialPath, tuttavia, ha permesso di realizzare considerevoli risparmi in termini di costi e tempi rispetto all'uso delle celle per liquidi tradizionali, aspetto che rende questo modulo la soluzione ideale per le applicazioni farmaceutiche.

Lo spettrometro FTIR Cary 630 con DialPath ha fornito un'alta linearità di calibrazione, fino al 190% di simeticone, e un'eccellente ripetibilità. L'eccellente accuratezza e precisione dei dati analitici ottenuti per la misura del simeticone hanno dimostrato l'efficacia della strumentazione, del metodo e dei risultati analitici.

Lo spettrometro FTIR Cary 630 soddisfa i requisiti prestazionali delle farmacopee internazionali tra cui la farmacopea europea, degli Stati Uniti, dell'India e del Giappone. Il software MicroLab Pharma opzionale facilita il rispetto della conformità alle normative US FDA 21 CFR Parte 11, Allegato 11 della UE e altre analoghe normative nazionali sui dati elettronici.

Bibliografia

1. Simeticone Emulsion. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP43-NF38-4044). ID documento: GUID-4965A93F-3617-485C-87B4-1DFBDF33EC3F_4_en-US.

www.agilent.com/chem

DE44297.9470717593

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
Stampato negli Stati Uniti, 14 aprile 2021
5994-3046ITE