

Desenvolvimento e Validação de Método Analítico para Quantificação de Impurezas Elementares em IFA (Insumo Farmacêutico Ativo) por ICP-MS

Diego Figueiredo Laira^{1*}, Rafael Wihby Leite^{2*}, Pedro Vitoriano Oliveira^{1*}

1 – Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

2 – Eurofarma Laboratórios S/A

diego.laira@hotmail.com

Resumo: Os novos padrões e diretrizes para a determinação de impurezas elementares em insumos farmacêuticos ativos (IFA) geraram um maior interesse no desenvolvimento de métodos para quantificá-las. Com os níveis de especificações cada vez mais baixos para concentrações de impurezas elementares em insumos e medicamentos, os métodos desenvolvidos por espectrometria de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), por apresentarem sensibilidade analítica superior as demais técnicas, são os mais indicados para atender aos critérios para todos os elementos previstos no capítulo 232 da USP (*United States Pharmacopeia*). A grande variedade de IFAs existentes requer um cuidado especial na etapa de preparo de amostra, para que o método a ser desenvolvido seja robusto e atenda a todos os requisitos de validação exigidos pelos guias analíticos presentes na farmacopeia. Assim, o emprego de forno de micro-ondas com frasco fechado para a digestão de amostra se torna indispensável durante a etapa de preparo de amostras. Por fim, os resultados serão discutidos com base na otimização dos parâmetros do ICP-MS, como plasma e o próprio espectrômetro de massa, na presença e na ausência de amostra e com a necessidade ou não de utilização de padrões internos, visando a correção de erros aleatórios intrínsecos às medidas do ICP-MS, para que protocolos com resultados precisos e exatos sejam produzidos.

Palavras-chave: *impurezas elementares, desenvolvimento de método, insumo farmacêutico ativo, plasma indutivamente acoplado-espectrômetro de massa, USP 232/233.*

Development and Validation of Analytical Method for Quantification of Elementary Impurities in API (Active Pharmaceutical Ingredient) by ICP-MS

Abstract: The new standards and guidelines for the determination of elemental impurities in active pharmaceutical ingredients (API) have generated great interest in the development of methods for quantification of them. The smaller and smaller specifications for concentrations of elemental impurities in raw materials and drugs requires the development of methods with high sensitivity, such as inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) in comparison to other techniques. Due to this main characteristic, ICP-MS is the most indicated to meet the criteria for all elements set in Chapter 232 of the USP (*United States Pharmacopeia*). The wide variety of existing APIs requires special care in the sample preparation step to guarantee that the method to be developed is robust and meets all the validation requirements demanded by the analytical guidelines present in the pharmacopeia. Therefore, the use of microwave oven with a closed flask for sample digestion becomes indispensable during the sample preparation stage. Finally, the results will be discussed based on the optimization of ICP-MS parameters, such as plasma and mass spectrometer itself, in the presence and absence of sample and according of need or not of using internal standards, aiming at the correction of random errors, intrinsic for the ICP-MS measurements, allowing protocols with precise and exact results.

Keywords: *elemental impurities, method development, active pharmaceutical ingredient, inductively coupled plasma-mass spectrometry, USP 232/233.*

Introdução

Os fabricantes e fornecedores de insumos farmacêuticos ativos (IFAs) e excipientes e as indústrias farmacêuticas estão preocupados com o impacto dos novos padrões e diretrizes para determinação de impurezas elementares em seus produtos. Atualmente, quando aplicável, os fornecedores demonstram que seus insumos cumprem os limites de concentração presentes, principalmente, no capítulo 232 da USP (*United States Pharmacopeia*) e do conselho internacional

de harmonização (ICH) Q3D, para impurezas elementares. Porém, a grande maioria das indústrias farmacêuticas está solicitando uma avaliação quantitativa extensa de todas as impurezas elementares presentes e, potencialmente presentes, nos insumos para demonstrar que os medicamentos produzidos a partir dos mesmos estão em conformidade com os novos padrões e atendem às recomendações das novas diretrizes presentes nos capítulos 232 e 233 da USP.¹ Seguindo as indicações presentes no capítulo 233 da USP, os métodos analíticos baseados em espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) são as alternativas mais adequadas para realizar análises multi-elementares e com sensibilidade para atender as demandas e requisitos da indústria farmacêutica. A principal vantagem que o método de ICP-MS apresenta em relação ao de ICP OES está relacionada a possibilidade de realizar determinações em concentrações de ultra traço (ng L^{-1}) até valores mais elevados em soluções (mg L^{-1}). Assim, como cada vez mais são esperados níveis de especificações muito baixos para concentrações de impurezas elementares em insumos e medicamentos, os métodos de ICP-MS, por apresentar sensibilidade analítica superior ao ICP OES, são mais indicados para atender aos critérios para todos os elementos previstos no capítulo 232 da USP.^{1,2} Atualmente, a grande maioria das indústrias farmacêuticas possui um portfólio de produtos muito amplo e diferenciado que deve ser submetido aos testes recomendados pelo capítulo 232 da USP.³ Por se tratar de variadas amostras, que podem ser compostas por matéria orgânica e/ou inorgânica, o preparo de amostras torna-se parte fundamental para o desenvolvimento de um método analítico robusto e que atenda a todos os outros critérios de validação exigidos pelos guias analíticos da farmacopeia. Com isso, o emprego de forno de micro-ondas com frasco fechado para a digestão de amostra se torna indispensável durante a etapa de preparo de amostras. Desta forma, é crítico otimizar os métodos de preparo de amostras baseados na digestão com aquecimento assistido por micro-ondas, sejam daquelas amostras com alto teor de matéria orgânica ou de matéria inorgânica, com mistura oxidante concentrada ou diluída ($\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$) e agentes complexantes. Para amostras líquidas e solúveis em água uma simples diluição seria a etapa preferida para o preparo, no entanto, devido às interferências que podem ocorrer, a comparação de resultados obtidos com diluição das amostras com aquelas digeridas faz se necessário.⁴

Outro aspecto determinante é a otimização dos parâmetros de operação do ICP-MS, tais como os do plasma como fonte de íons para o MS (potência, fluxos dos gases do plasma, introdução de amostra, e taxa de aspiração da amostra) e os do espectrômetro de massas (distância do cone de amostragem, potenciais do quadrupolo e célula de reação/colisão, bem como do detector) para obtenção de sinais com a maior razão sinal ruído. É importante destacar que a otimização dos parâmetros instrumentais deve ser feita na ausência e presença da amostra para avaliar a resposta analítica na presença de contaminantes ou possíveis interferentes, e como proceder para minimizar ou eliminar esses efeitos.⁵ Finalmente, nas determinações por ICP-MS é necessário avaliar a necessidade ou não de utilização de padrões internos, visando a correção de erros aleatórios intrínsecos às medidas obtidas no equipamento, para que os protocolos produzam resultados exatos e precisos.

Neste sentido, o objetivo do trabalho é desenvolver método analítico para a quantificação de impurezas elementares em insumos farmacêuticos ativos, utilizados na produção de medicamentos comercializados mundialmente, por espectrometria de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) para atendimento dos Capítulos 232 e 233 da USP e da diretriz do ICH Q3D.

Experimental

Os experimentos realizados estão divididos em 3 partes principais: (i) otimização do ICP-MS para os ensaios iniciais e determinações pretendidas; (ii) avaliação da necessidade de utilização de padrão interno (Sc, In e Tb); e (iii) análise de um insumo farmacêutico ativo (IFA) valaciclovir com apenas diluição da amostra.

Todos os experimentos foram realizados em um espectrômetro de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente, modelo Agilent 7800 (Agilent Technologies, Tóquio, Japão), simples quadropolo, com um amostrador automático Agilent SPS 4 (Santa Clara, EUA). O instrumento é equipado com um gerador de RF de 27 MHz de estado sólido e um sistema ORS4® (Agilent Technologies, Tóquio, Japão) para remover interferências isobáricas através de DEC/DIC usando He de alta pureza (99,999% v v⁻¹). O software utilizado para o controle do equipamento é o *Mass Hunter*.

Para a etapa de preparo de amostras pretende-se utilizar um forno micro-ondas com frasco fechado, modelo Multiwave Pro (Anton-Paar, Graz, Austria).

Resultados e Discussão

Otimização do ICP-MS para as determinações de 24 elementos

Soluções padrões multi-elementares de 1 µg mL⁻¹ e 10 µg mL⁻¹ de Ce, Co, Li, Tl e Y ICP-MS Stock Tuning Solution) foram utilizadas para otimização das condições operacionais do ICP-MS. As soluções analíticas foram obtidas de soluções padrões de 1000 mg L⁻¹ dos 24 elementos (Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Se, Sb, Sn, Tl e V) de interesse nesta pesquisa, adquiridos da Agilent Technologies. Soluções de ácido de HNO₃ (ACS ISSO, Supelco) foram utilizadas para preparar soluções analíticas e de limpeza do ICP-MS. Em todos os experimentos foi utilizada água Tipo 1 (Millipore).

O capítulo 233 da USP apresenta a concentração máxima permitida de cada elemento na amostra a ser analisada, chamado de valor *J*. A equação para a definição do valor de *J* é baseada em três parâmetros principais, que são: (i) exposição diária permitida (PDE) para um dado elemento, que depende da via de administração do medicamento; (ii) dosagem máxima diária (DMD) permitida para o medicamento; e (iii) o fator de diluição (FD) envolvido no processo de preparo das amostras para posterior análise, utilizando os métodos espectroscópicos. O valor de *J* é calculado de acordo com a equação abaixo:

$$J = \frac{PDE}{DMD \cdot FD}$$

Sendo assim, com a variação desses parâmetros, podemos encontrar os valores necessários para detecção em diferentes ordens de grandeza, que podem estar na faixa de mg L⁻¹ até ng L⁻¹ nas soluções.⁶

Os padrões dos 24 elementos (Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Se, Sb, Sn, Tl e V) foram preparados seguindo as concentrações de 0,25 de *J* até 1,5 de *J*. Esses valores foram definidos utilizando o IFA Cloridrato de Valaciclovir como referência, variando os valores de PDE para cada elemento, mantendo o valor de DMD como equivalente a 8g e, por fim, utilizando o fator de diluição como 1000. Ou seja, nestas condições as menores concentrações foram

de Cd, variando de $0,156 \mu\text{g L}^{-1}$ (0,25 J) a $0,938 \mu\text{g L}^{-1}$ (1,5 J) e as maiores para Cr, variando de $343 \mu\text{g L}^{-1}$ (0,25J) a $2.062 \mu\text{g L}^{-1}$ (1,5 J). As soluções padrões foram preparadas em solução de ácido nítrico 2% (v v⁻¹). A curva de calibração com cinco pontos (0,25J a 1,5J), além do ponto zero, que foi definido pela injeção do branco (dilúente utilizado no método). Os resultados mostraram que os valores encontrados de repetibilidade para os 24 elementos foram muito precisos (n = 3 medidas), apresentando faixas de desvio padrão relativo (DPR), variando de 3,6% para o elemento Cu a 8,5% para o elemento Ag. Os valores de coeficiente de correlação linear (R²) também apresentaram resultados próximos do ideal (1,0). A vantagem de se trabalhar com soluções muito diluídas se dá por conta da própria sensibilidade intrínseca do método de ICP-MS, minimiza efeito de memória para alguns elementos (e.g. Ag, Cu e Hg), que podem causar em concentrações mais elevadas e ajuda na diluição de concomitantes que podem produzir interferências.

Avaliação do uso de Padrões Internos (Sc, In e Tb)

O padrão interno ideal deve ter massas próximas às dos analitos e também comportamento semelhante frente as variações instrumentais, sendo assim, três elementos foram escolhidos para serem investigados (Sc, m/z=45; In m/z=115; e Tb m/z=159). Com as melhores condições instrumentais estabelecidas para o ICP-MS e com esse primeiro intervalo linear das concentrações da curva de calibração pré-estabelecido, foi avaliada a necessidade de utilização de padrão interno para a quantificação dos analitos de interesse. Foram realizados testes com 1 mg L^{-1} e 10 mg L^{-1} de Sc, In e Tb como padrões internos.

As concentrações dos padrões internos em 1 mg L^{-1} apresentaram resultados mais precisos, tanto para os valores de intensidades de sinais obtidos para as curvas de calibração quanto para as quantificações das amostras. As intensidades de sinais dos elementos Sc e Tb se mantiveram constantes em diferentes tipos de respostas quando a concentração de 1 mg L^{-1} foi utilizada. Por outro lado, quando concentrações de 10 mg L^{-1} foram utilizadas, o comportamento não seguiu a tendência esperada frente aos analitos monitorados. Com a concentração em 10 mg L^{-1} houve variações entre as injeções, fazendo com o que os resultados também sofressem variação, afetando os critérios de aceitação, como desvio padrão relativo (%DPR), além da quantificação dos elementos. A Tabela 1 apresenta os resultados comparativos entre as quantificações dos analitos de interesse para avaliar a exatidão no nível de 1,5 de J, utilizando os três elementos como padrão interno. Dentre os 24 elementos analisados, foram escolhidos três elementos representativos, um de massa atômica baixa (Li, m/z=7), um de massa atômica média (Pd, m/z=105) e um de massa atômica alta (Pb, m/z=208).

Tabela 1 – Comparação entre a recuperação dos analitos de interesse para o teste de exatidão de acordo com o padrão interno utilizado em soluções analíticas.

Elemento	Recuperação (%)				Critério de Aceitação (%)
	Sem Padrão Interno	Sc	In	Tb	
Li (m/z = 7)	72,2	86,1	21,6	79,9	70,0 - 150,0
Pd (m/z = 105)	82,9	96,4	24,9	89,6	
Pb (m/z = 208)	82,2	95,9	24,4	89,4	

A partir dos resultados expressos na Tabela 1, temos que, em comparação com a quantificação sem a utilização do padrão interno, o elemento que melhor respondeu como padrão interno foi o Sc, independentemente das massas, pois apresentou melhores resultados de recuperação para os três analitos de interesse, tanto em relação aos outros padrões internos quanto em comparação a quantificação direta sem a utilização dos padrões internos. O Tb também apresentou resultados satisfatórios, porém inferiores e mais próximos ao limite inferior do critério de aceitação se comparado com o Sc. Por fim, o In apresentou resultados ruins muito provavelmente devido as variações sofridas durante as injeções.

Análise do IFA cloridrato de valaciclovir

A avaliação da eficiência do preparo de amostra apenas com diluição foi feita a partir de testes de exatidão, que consiste em preparar amostras com adições de concentrações conhecidas dos 24 elementos de interesse e, após determinações dos elementos, avaliar a recuperação dos valores adicionados. As concentrações adicionadas foram feitas conforme valor de J (concentração máxima permitida do analito em solução aquosa), que leva em conta a via de administração do medicamento, a dosagem máxima diária e fator de diluição do preparo, segundo os parâmetros do capítulo 232 da USP. No caso, para o IFA cloridrato de valaciclovir, os elementos de interesse foram adicionados na proporção de 0,50 de J; 1,0 de J e 1,5 de J, todas elas na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$. Nestas determinações foi utilizado o padrão interno Sc para correções de eventuais problemas associados à introdução da amostra e desvios instrumentais. As recuperações variaram de 88,5% para o elemento Co ($m/z=59$) até 144,5% para o As ($m/z=75$), mostrando que neste caso, as determinações tendo como preparo de amostra com apenas uma diluição em meio de HNO_3 2 % v v⁻¹ produz resultados exatos e precisos.

Conclusões

A análise do IFA cloridrato de valaciclovir para as determinações de Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Se, Sb, Sn, Tl e V mostrou que o método por ICP-MS após otimização, com simples diluição da amostra e uso de padrão interno Sc produziu resultado promissores e dentro dos limites preconizados pela USP 232 e 233, podendo ser ajustado para validação e aplicação em rotina de laboratório.

Referências

1. LI, Gang et al. Elemental impurities in pharmaceutical excipients. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 104, n. 12, p. 4197-4206, (2015).
2. STØVING, Celina et al. Development and validation of an ICP-OES method for quantitation of elemental impurities in tablets according to coming US pharmacopeia chapters. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 84, p. 209-214, 2013.
3. R. Lorençato, G. G. A. de Carvalho, P. V. Oliveira, Direct analysis of liquid drugs by ICP-MS using aerosol dilution, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, Vol 35, n. 10, October 2020, p. 2077-2396.
4. The United States Pharmacopeia Convention, The United States Pharmacopeia, Chapter 232: Elemental Impurities - Limits. First Supplement to USP 40-NF 35. Oficial em 1º. De Dezembro de 2017. Disponível em <<https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/our-work/chemical-medicines/keyissues/232-40-35-1s.pdf>>. Acesso em 03 de Junho de 2021.

5. BECKER, J. S. Inorganic mass spectrometry: principles and applications. Chichester, England: John Wiley & Sons, 2007.
6. The United States Pharmacopeia Convention, The United States Pharmacopeia, Chapter 233: Elemental Impurities - Procedures. Revision Bulletin. Oficial em 1º. De Abril de 2015. Disponível em www.usp.org/sites/default/files/usp/document/ourwork/chemicalmedicines/keyissues/c233.pdf. Acesso em 08 de Novembro de 2022.