

## ÍNDICE DE RETENÇÃO LINEAR EXPERIMENTAL PARA EXTRAÍVEIS ORGÂNICOS SEMIVOLÁTEIS

Ângela Oliveira Francisco <sup>1,2\*</sup>, Celso Blatt <sup>3</sup>, Lourdes Marcela Yataco <sup>2</sup>, Paulo R. H. Moreno <sup>1\*</sup>

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

2 – Ache Laboratórios Farmacêuticos

3 – Agilent Technologies do Brasil

[prmoreno@iq.usp.br](mailto:prmoreno@iq.usp.br); [angela.francisco@ache.com.br](mailto:angela.francisco@ache.com.br)

**Resumo:** Extraíveis orgânicos são compostos que podem ser extraídos de elastômeros, plásticos e revestimentos do material de embalagem do medicamento, na presença de solvente(s) e/ou condição(ões) apropriado(s). A importância dos extraíveis está relacionada à sua identidade, concentração e toxicidade, pois pertencem a uma categoria de impurezas denominadas lixiviáveis, que podem estar presentes no medicamento, afetando sua segurança, qualidade e eficácia. Este artigo analisou padrões de referência conhecidos como extraíveis de materiais de embalagem por cromatografia à gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), e suas identidades foram obtidas comparando-se o tempo de retenção, índice de retenção linear, os espectros de massas obtidos com a biblioteca instalada no equipamento e com a literatura, quando disponível. A partir dos padrões de referência dos extraíveis analisados, foi confirmada a identificação de um total de 17 compostos, os principais compostos presentes foram antioxidantes, plastificantes, monômeros e ácido esteárico. Seguindo a metodologia proposta, é possível utilizar os índices de retenção linear determinados neste artigo como referência em um novo experimento, visto que os índices de retenção linear aqui obtidos também foram comparados com os valores disponíveis na NIST e na literatura. Esta correlação possibilita a classificação da identificação de um extraível de uma categoria provisória, para confiável quando o padrão de referência não estiver disponível.

**Palavras-chave:** *índice de retenção linear, compostos semivoláteis, extraíveis.*

## EXPERIMENTAL LINEAR RETENTION INDEX FOR SEMIVOLATILE ORGANIC EXTRACTABLES

**Abstract:** Organic extractables are compounds that can be extracted from elastomeric, plastic and coatings of the drug product packaging material, in the presence of an appropriate solvent(s) and/or condition(s). The importance of extractables is related to their identity, concentration, and toxicity, as they belong to a category of impurities called leachables, which may be present in drug product, affecting their safety, quality, and efficacy. This article analyzed reference standards known as extractables from packaging material by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), and their identities were obtained by comparing the retention time, linear retention index, mass spectra obtained with the equipment library and with the literature when available. From extractables standards analyzed, a total of 17 compounds had their identification confirmed, the main compounds present were antioxidants, plasticizers, monomers, and stearic acid. Following this methodology, it is possible to use the linear retention index determined in this article as a reference in a new experiment. This is possible because the indexes obtained in this study were validated by comparison with the NIST and literature values. This correlation makes it possible to classify the identification of an extractable from a tentative category to confident when the reference standard is not available.

**Keywords:** *linear retention index, semi volatiles, extractables.*

## Introdução

Extraíveis orgânicos são compostos que podem ser extraídos de componentes elastoméricos, plásticos ou revestimentos do material de embalagem de um medicamento, quando na presença de solvente(s) apropriado(s)<sup>1</sup>.

A importância dos extraíveis, está relacionada a sua identidade, concentração e toxicidade, visto que pertencem a uma categoria de impurezas denominadas lixiviáveis, que podem estar presentes no medicamento, afetando sua segurança, qualidade e eficácia.

O foco da etapa de extração é a correta identificação destes extraíveis, visto que a identificação antecede a etapa de avaliação de toxicidade. Uma avaliação de risco significativa, rigorosa, adequada e precisa de um extraível ou lixiviável só pode ser obtida quando o extraível foi corretamente identificado com alto grau de confiança. Por definição, um composto foi identificado se puder ser atribuído um nome químico adequado, uma identificação apropriada número (por exemplo, um número de registro CAS) e uma estrutura química com um grau de confiança aceitavelmente alto<sup>2</sup>.

O grau de confiança atribuído à identificação é classificado como parcial, provisória, confiável e confirmada<sup>2</sup>. Um composto pode ser considerado como parcialmente identificado, se puder ser atribuído a uma classe de compostos que compartilham uma característica funcional comum<sup>3</sup>. Identificações baseadas unicamente na correspondência espectral de massa são identificações provisórias, pois esta é uma identificação “unidimensional”, onde a peça única de evidência é o seu espectro de massas<sup>3</sup>.

Uma identificação de categoria provisória, pode se tornar tridimensional, ou como é chamada categoria confirmada, analisando-se um padrão autêntico (espectro de massas e tempo de retenção). Outra possibilidade é que a categoria provisória obtenha evidências adicionais, tornando-se uma identificação confiável, sendo esta considerada bidimensional, por ser baseada em duas peças independentes de informações. Para se tornar confiável, além da correspondência espectral presente na categoria provisória, é preciso contribuir com evidências adicionais<sup>3</sup>.

É aceito como evidência adicional, informações presentes na documentação de apoio do fabricante, que possibilite correlacionar o composto obtido experimentalmente com a composição do material de embalagem, a confirmação da identidade do composto por análise em técnica ortogonal considerando que o composto produz resposta tanto na cromatografia líquida quanto na cromatografia à gás acoplada a um espectrômetro de massas, comparação do espectro obtido experimentalmente antes e após uma derivatização, ou correspondência com o índice de retenção<sup>3,9</sup>.

O índice de retenção de um componente é um número, obtido por interpolação, relacionando-se o tempo de retenção do componente em estudo com o tempo de retenção de dois padrões, geralmente hidrocarbonetos na cromatografia à gás, que são eluídos antes e após o pico do composto de interesse<sup>4</sup>. A correlação do índice de retenção obtido experimentalmente, com o índice de retenção presente em bibliotecas como a NIST, permite a obtenção de um critério adicional para elevar a classificação da identificação dos extraíveis, através da comprovação de evidência adicional do índice de retenção.

O objetivo deste estudo foi a construção de uma base de dados através da injeção de padrões de referência, conhecidamente atribuídos à extraíveis orgânicos de materiais de embalagens, e sua comparação com os índices de retenção presentes na literatura e na NIST, quando disponíveis.

## Experimental

As vidrarias empregadas para preparação e análise foram previamente descontaminadas em solução de ácido nítrico 5%.

Os padrões analisados para determinação do índice de retenção foram preparados em diclorometano na concentração de 5µg/mL a partir da solução estoque 200µg/mL em metanol sendo estes: 2-fluorobifenila, bisfenol A, Bis-2-etil-ftalato, Irganox 415, caprolactama, BHT, difenilamina, ácido esteárico e Irgafos 168. Adicionalmente contemplou-se os padrões para teste de Grob diluindo-se 1mL do padrão de referência disponível comercialmente em 20mL de diclorometano.

A mistura de padrões foi analisada por injeção direta em Cromatógrafo a gás Agilent 7890B Series GC (Agilent Santa Clara, CA, USA) acoplado a detector de massas 5977B Quadrupolo (Agilent Santa Clara, CA, USA) e equipado com coluna HP-5MS (30m x 0.25mm x 0.25µm) (Agilent, Santa Clara, CA, USA). As condições cromatográficas seguiram conforme descrito: 40°C por 1 minuto, com aquecimento subsequente de 10°C/minuto até 280°C, manteve-se por 2 minutos, na sequência aqueceu-se 15°C/minuto até 310°C, manteve-se por 10 minutos; gás de arraste Hélio fluxo de 1,2 mL/minuto; temperatura do injetor de 300°C; modo *splitless*, *liner* 900µL, volume de injeção de 1µL, temperatura da linha de transferência 320°C, fonte de ionização por elétrons 70 eV, temperatura da fonte 300°C, temperatura do quadrupolo 150°C, intervalo de detecção do MS 33-650 (*m/z*).

O índice de retenção de linear (IR) foi calculado de acordo com Dool e Kratz<sup>6</sup>, utilizando uma série homóloga de *n*-alcanos (Sigma Aldrich, C8-C40). A identificação dos compostos semivoláteis foi realizada através da injeção dos padrões de referência, comparação dos índices de retenção, espectros de massa obtidos com as bibliotecas instaladas no equipamento (NIST 08/Willey 2014) e literatura<sup>6,7,8,9</sup>.

## Resultados e discussão

A Tabela 1 contém a composição química, o número CAS, o tempo de retenção do composto, o índice de retenção calculado, o índice de retenção da NIST/literatura e o valor do *match factor* atribuído pela NIST.

**Tabela 1:** Nomenclatura do composto identificado, número CAS, tempo de retenção, índice de retenção linear experimental, índice de retenção da base de dados/literatura, desvio padrão e *match factor* NIST.

Composto	CAS	Tempo de retenção do Composto	IA <sup>a</sup>	NIST (Base de dados)/Literatura <sup>b</sup>	Desvio Padrão	Match Factor NIST <sup>c</sup>
1-Octanol	111-87-5	8,368	1071	1068	1,8	NI
Nonanal	124-19-6	8,918	1106	1102	2,5	798
2,6-dimetil-fenol	576-26-1	8,967	1109	1105	2,7	871
Ácido 2-etil-hexanoico	149-57-5	9,030	1113	1122	6,4	675
2,6-dimetil-anilina	87-62-7	9,915	1172	1167	3,4	NI
Caprolactama	105-60-2	11,078	1252	1244	5,5	880
2-Fluorobifenila	321-60-8	12,770	1375	1346	20,5	944
Metil undecanoato	1731-86-8	13,425	1425	1427	1,3	859
Diciclo-hexilamina	101-83-7	13,565	1436	1431	3,6	771
Di- <i>tert</i> -butil metil fenol (BHT)	128-37-0	14,623	1520	1518	1,5	935
Metil laurato	111-82-0	14,679	1525	1527	1,5	844
Difenilamina	122-39-4	15,933	1631	1637	4,5	921
Ácido esteárico	57-11-4	21,275	2158	2178	14,1	778
Bisfenol A	80-05-7	21,527	2186	2192	4,2	925
Bis-2-etil-ftalato	117-81-7	24,578	2555	2550	3,8	911
Irganox 415	96-69-5	26,465	2784	ND	ND	754
Irgafos 168	31570-04-4	32,310	3439	3396	30,2	797

<sup>a</sup>Índice de Retenção Calculado, <sup>b</sup>Índice de Retenção da Literatura, <sup>c</sup>Valor de *match factor* atribuído pela NIST.

NI: Não identificado, ND: não disponível

A tabela 1 apresenta os resultados experimentais obtidos para o índice de retenção dos padrões de referência de extraíveis orgânicos, e o comparativo destes resultados experimentais com os resultados já disponíveis em base de dados NIST, ou literatura.

Foram analisados 17 compostos, sendo padrões de referência de extraíveis e padrão para teste de Grob, utilizado para avaliação da performance do equipamento. Dos padrões de extraíveis identificados temos representantes de antioxidantes, plastificantes, monômeros, e o ácido esteárico que é o produto da reação do estearato de cálcio, empregado para capturar resíduos de ácidos fortes durante o processo de manufatura do polímero<sup>10</sup>.

Para maioria dos compostos o índice de retenção linear experimental está muito próximo ao índice de retenção presente na NIST ou na literatura. O intervalo de desvio padrão encontrado está entre 1,3 e 30,2. O valor mais discrepante de desvio padrão é observado para o Irgafos 168, sendo este um antioxidante adicionado no processo de fabricação de material polimérico para evitar degradação térmica e oxidativa<sup>10</sup>. Para o Irganox 415 não foram encontrados valores de índice de retenção na NIST nem na literatura.

## Conclusões

Através do estudo realizado foi possível obter o índice de retenção linear experimental para compostos conhecidamente atribuídos à extraíveis orgânicos de materiais de embalagens e comparar com os índices de retenção presentes na literatura e na NIST, quando disponíveis. Seguindo a metodologia proposta, é possível utilizar os índices de retenção linear determinados neste artigo como referência em um novo experimento. Visto que os índices de retenção linear determinados neste estudo também foram comparados com a NIST e com a literatura. Esta correlação possibilita a classificação da identificação de um extraível de uma categoria provisória, para confiável quando o padrão de referência não estiver disponível.

O intuito futuro deste estudo é ampliar a base de dados da metodologia proposta desafiando o índice de retenção linear de outros compostos extraíveis de materiais de embalagem, disponíveis como padrões de referência.

## Agradecimentos

Agradecemos ao apoio do Aché Laboratórios Farmacêuticos, Agilent Technologies do Brasil e Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

## Referências

1. Ball, D. et al.; *Leachables and Extractables Handbook*, 1<sup>ª</sup> ed., Wiley: New Jersey: 2012.
2. Jenke, D. *Extractables and Leachables Characterization of Drug Products, Packaging, Manufacturing and Delivery Systems, and Medical Devices*; Hoboken, NJ :Wiley, 2022.
3. [https://www.nelsonlabs.com/wp-content/uploads/2020/09/Good-ID-PracticesE\\_L\\_FINAL.pdf](https://www.nelsonlabs.com/wp-content/uploads/2020/09/Good-ID-PracticesE_L_FINAL.pdf), disponível em novembro de 2023.
4. Viegas, M. C., Bassoli, D. G.; *Química Nova*, 2007, 2031-2034.
5. Jenke, D. et al.; *PDA J Pharm Sci.* 2013, 67, 448-511.
6. Dool, V. D. H., Kratz, P. D. *Journal Chromatography A* **1963**, 11, 463-471. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X)
7. NIST. National Institute of Standards and Technology. US. Department of Commerce. <https://webbook.nist.gov>, disponível em outubro de 2023.
8. Kuhn, E. R.; *J. Sep. Sci.* 2001, 24, 473-476.
9. [https://www.nelsonlabs.com/wp-content/uploads/2020/12/Good-ID-Practices\\_Part4-002.pdf](https://www.nelsonlabs.com/wp-content/uploads/2020/12/Good-ID-Practices_Part4-002.pdf), disponível em novembro 2023.
10. Christiaens, Piet.; *Universe of Pre-filled Syringes and Injection Devices*, Gotemburgo, Suécia, 2023.