

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO POR  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA PARA DETERMINAÇÃO DE  
IMPUREZAS NO IODIXANOL”**

**Bruno Doratioto Rondon\***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE PROFISSIONAL EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA TECNOLÓGICA.

**Orientadora: Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass**

**\* empresa: United States Farmacopeia Brasil Ltda.**

**São Carlos - SP  
2013**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

R771dm Rondon, Bruno Doratioto.  
Desenvolvimento de método analítico por cromatografia  
líquida para determinação de impurezas no iodixanol / Bruno  
Doratioto Rondon. -- São Carlos : UFSCar, 2013.  
82 f.

Dissertação (Mestrado profissional) -- Universidade  
Federal de São Carlos, 2013.

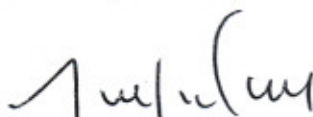
1. Cromatografia líquida. 2. Iodixanol. 3. Ortogonalidade.  
4. HILIC. 5. Núcleo fundido. I. Título.

CDD: 543.0894 (20<sup>a</sup>)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Departamento de Química  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
Curso de Mestrado Profissional

---

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestrado Profissional do candidato Bruno Doratioto Rondon, realizada em 17 de outubro de 2013:*



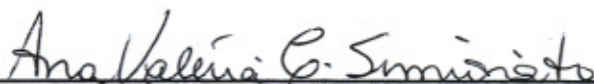
---

Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass



---

Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro



---

Profa. Dra. Ana Valéria Colnaghi Simionato

*Dedico esta dissertação à minha esposa e eterna companheira **Fernanda**, por sempre estar ao meu lado, me dando apoio, amor e carinho; à minha pequena **Rafaela**, pelo amor e pelos momentos de alegria que propicia a nossa linda família.*

*Aos meus pais, **Dorival e Luzia**, pela amizade, carinho, amor e por me ensinarem a ser quem sou e a trilhar os caminhos para alcançar meus objetivos.*

## *Agradecimentos*

Agradeço à Profa. Dra. Quezia B. Cass, minha orientadora, pela oportunidade de desenvolver este trabalho; pelos ensinamentos, orientações, paciência, apoio e confiança durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Neila Cassiano pela intensa colaboração intelectual, incentivo e principalmente pela amizade.

A todo corpo acadêmico, técnico e administrativo do Departamento de Química da UFSCar.

A United States Farmacopeia Brasil pela imensa oportunidade, disponibilidade de seus laboratórios, materiais e recursos, e de tornar possível a realização deste trabalho.

Aos meus colegas e amigos da USP Brasil, André Novaes, Andrea Rezemini, Cecília Emmerick, Kelly Sakiara, Luiz Rogério, Rafael Maranhão e Wanderson Guimarães, que me acompanharam e me apoiaram desde o início desta jornada.

A United States Pharmacopeia pelos padrões doados.

A todos os que contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1: Condições experimentais que afetam seletividade em cromatografia no modo reverso. ....	13
TABELA 1.2: Comparação de colunas através de valores de F.....	17
TABELA 1.3: Classificação de colunas utilizadas no modo HILIC em relação à seletividade principal. ....	21
TABELA 1.4: Figuras de mérito requeridas de acordo com a categoria.....	24
TABELA 3.1: Massas e concentrações utilizadas na aplicação do método de impurezas em três diferentes lotes de amostras de matéria prima iodixanol. ....	35
TABELA 3.2: Massas e concentrações utilizadas na aplicação do método de teor em três diferentes lotes de amostras de matéria prima iodixanol.....	38
TABELA 4.1: Valores calculados de log P para o iodixanol e suas impurezas conhecidas .....	40
TABELA 4.2: Condições cromatográficas exploratórias no modo HILIC. ....	41
TABELA 4.3: Ordem de força dos solventes em HILIC. ....	44
TABELA 4.4: Composições de fase móvel para estudo de modificadores orgânicos. ....	44
TABELA 4.5: Composições de fase móvel para estudo de pH e aditivos. ....	46
TABELA 4.6: Condições cromatográficas do método desenvolvido.....	50
TABELA 4.7: Tempos de Retenções Relativos .....	51
TABELA 4.8: Especificação dos limites máximos de cada impureza conhecida, preconizado na monografia de iodixanol da USP 36.....	52
TABELA 4.9: Parâmetros e resultados obtidos de adequabilidade de sistema.....	54
TABELA 4.10: Parâmetros de linearidade, limites de detecção e quantificação do método. ....	58
TABELA 4.11: Exatidão e precisão da curva analítica para a impureza C .....	58
TABELA 4.12: Exatidão e precisão da curva analítica para a impureza D .....	59
TABELA 4.13: Exatidão e precisão da curva analítica para a impureza E .....	59

TABELA 4.14: Critério de aceitação para curva analítica.....	59
TABELA 4.15: Precisão e exatidão intra e interdias para a impureza C.....	60
TABELA 4.16: Precisão e exatidão intra e interdias para a impureza D.....	60
TABELA 4.17: Precisão e exatidão intra e interdias para a impureza E .....	61
TABELA 4.18: Critério de aceitação para exatidão .....	61
TABELA 4.19: Critérios de aceitação para precisão .....	61
TABELA 4.20: Parâmetros e resultados obtidos da robustez do método.....	63
TABELA 4.21: Parâmetros e resultados obtidos para estabilidade de soluções .....	64
TABELA 4.22: Especificação proposta para teor de iodixanol por HPLC.....	65
TABELA 4.23: Parâmetros e resultados obtidos de adequabilidade de sistema.....	65
TABELA 4.24: Parâmetros de linearidade e limite de quantificação do método.....	68
TABELA 4.25: Exatidão e precisão da curva analítica para o iodixanol .....	68
TABELA 4.26: Critério de aceitação para curva analítica.....	68
TABELA 4.27: Precisão e exatidão intra e interdias para o iodixanol.....	69
TABELA 4.28: Critério de aceitação para exatidão .....	69
TABELA 4.29: Critérios de aceitação para precisão .....	70
TABELA 4.30: Parâmetros e resultados obtidos da robustez do método.....	71
TABELA 4.31: Parâmetros e resultados obtidos para estabilidade de soluções .....	72
TABELA 4.32: Análise de impurezas C, D e E, e teor em três diferentes lotes de amostras de matéria prima iodixanol.....	72
TABELA 4.33: Parâmetros da curva analítica obtida na aplicação do método de teor. ....	74
TABELA 4.34: Parâmetros das curvas analíticas obtidas na aplicação do método de impurezas conhecidas.....	76

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1: Estrutura molecular do iodixanol e os respectivos estereoisômeros exo-exo, exo-endo, e endo-endo.....	3
FIGURA 1.2: Estrutura molecular do N-acetil iodixanol ciclizado .....	4
FIGURA 1.3: Estrutura molecular do deacetil iodixanol (composto relacionado C).....	4
FIGURA 1.4: Estrutura molecular do iodixanol ciclizado (composto relacionado E) ...	5
FIGURA 1.5: Estrutura molecular do iopentol (composto relacionado D).....	7
FIGURA 1.6: Cromatograma representativo do método 1 de impurezas descrito na USP 36.....	9
FIGURA 1.7: Cromatograma representativo do método 2 de impurezas descrito na USP 36.....	10
FIGURA 1.8: Ilustrações de diversos tipos de interações analito-fase estacionária no modo reverso .....	15
FIGURA 1.9: Representação gráfica do micro ambiente ao redor da superfície da fase estacionária no modo por interação hidrofílica .....	19
FIGURA 1.10: Ilustração de interação analito/fase estacionária no modo por interação hidrofílica .....	19
FIGURA 1.11: Ilustração da comparação da difusão de um analito entre colunas contendo partículas do tipo fused-core e convencionais (núcleo poroso) .....	22
FIGURA 4.1: Representação gráfica dos diferentes modos em HPLC e suas aplicações para a separação de moléculas de diferentes polaridades .....	40
FIGURA 4.2: Cromatogramas representativos da etapa de otimização de método. Condições cromatográficas: vazão de 1,0 mL/min; composição de fase móvel: acetonitrila e formiato de amônio 50 mmol·L <sup>-1</sup> pH 3,2 (90:10, v/v); variações de temperatura da coluna.....	43
FIGURA 4.3: Cromatogramas representativos da etapa de otimização de método. Condições cromatográficas: vazão de 1,0 mL/min; temperatura da coluna: 20 °C; variações de composição de fase móvel (modificador orgânico) .....	45
FIGURA 4.4: Cromatogramas representativos da etapa de otimização de método. Condições cromatográficas: vazão de 1,0 mL/min; temperatura da coluna: 20 °C; variações de composição de fase móvel (aditivos e pH).....	47



FIGURA 4.5: Cromatogramas representativos da etapa de otimização de método. Condições cromatográficas: vazão de 1,0 mL/min; temperatura da coluna: 20 °C; variações de composição de fase móvel (força iônica) .....	48
FIGURA 4.6: Cromatograma representativo da etapa de otimização de método. Condições cromatográficas: vazão de 1,0 mL/min; composição de fase móvel: acetonitrila e ácido fórmico 1 mmol·L <sup>-1</sup> ajustada com hidróxido de amônio para pH 3,2 (92:08, v/v); temperatura da coluna: 20 °C.....	49
FIGURA 4.7: Cromatogramas representativos da etapa de otimização de método. Condições cromatográficas: composição de fase móvel: acetonitrila e ácido fórmico 1 mmol·L <sup>-1</sup> ajustada com hidróxido de amônio para pH 3,2 (92:08, v/v); temperatura da coluna: 20 °C; variações de vazão. ....	49
FIGURA 4.8: Cromatograma representativo de solução contendo as impurezas C, D e E e o iodixanol no método final desenvolvido para quantificação de impurezas. ...	51
FIGURA 4.9: Cromatograma representativo de solução contendo iodixanol no método final desenvolvido para quantificação de teor.....	51
FIGURA 4.10: Cromatogramas representativos do teste de seletividade (impurezas). .....	55
FIGURA 4.11: Curva analítica obtida da impureza C. ....	56
FIGURA 4.12: Curva analítica obtida da impureza D. ....	57
FIGURA 4.13: Curva analítica obtida da impureza E. ....	57
FIGURA 4.14: Cromatograma representativo de solução de controle de qualidade de concentração média, contendo as impurezas C, D e E.....	62
FIGURA 4.15: Cromatogramas representativos do teste de seletividade (teor).....	66
FIGURA 4.16: Curva analítica obtida de teor de iodixanol. ....	67
FIGURA 4.17: Cromatogramas representativos de soluções amostra de iodixanol na quantificação de teor. ....	73
FIGURA 4.18: Cromatogramas representativos de soluções amostra de iodixanol na quantificação de impurezas conhecidas.....	75

## LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1.1: Esquema reacional de síntese de iodixanol descrito na patente número 6974882 .....	6
ESQUEMA 1.2: Proposta de formação do iopentol (composto relacionado D), como subproduto no final do processo de síntese de iodixanol. ....	7

## LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1.1: Resolução entre dois picos adjacentes .....	11
EQUAÇÃO 1.2: Função de distância ponderada entre duas colunas 1 e 2 .....	16
EQUAÇÃO 1.3: $\log P$ (coeficiente de partição em sistema de água/octanol).....	18

## RESUMO

### DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA PARA DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS NO IODIXANOL.

Este trabalho descreve pela primeira vez um método isocrático em uma única corrida analítica para quantificação das impurezas deacetil iodixanol (iodixanol composto relacionado C), iopentol (iodixanol composto relacionado D) e iodixanol ciclizado (iodixanol composto relacionado E) na matéria-prima iodixanol. Iodixanol é um composto dimerico, não-iônico, solúvel em água, usado para contraste para raios X com administração intravascular. As impurezas A e B não foram avaliadas neste trabalho, uma vez que não existem padrões disponíveis comercialmente dos mesmos. O método também foi validado para a quantificação de teor, uma vez que não existe método cromatográfico descrito no compêndio atual da USP para o teor. Estas impurezas podem ser formadas durante a síntese do iodixanol, e a importância da quantificação destas está relacionada à toxicidade. Neste trabalho foram avaliados os modos de eluição reverso e por interação hidrofílica (HILIC). O modo HILIC foi o selecionado, pois ofereceu boa eficiência cromatográfica com boa seletividade. Em ambos os modos, o uso de colunas de tecnologia fused-core foi empregado, por apresentar alta eficiência devido à sua melhor transferência de massa em comparação com as colunas analíticas convencionais. A separação cromatográfica foi conduzida utilizando-se a coluna analítica kinetex® HILIC (150 x 4,6 mm; 2,6  $\mu$ m) a 20 °C e acetonitrila-ácido fórmico (pH 3,2; 1,0 mmol·L<sup>-1</sup>) (92:08, v/v) com 0,8 mL/min de vazão. Os compostos foram monitorados a 243 nm e o tempo total de análise foi de 45 min. Os métodos foram validados em acordo com as recomendações atuais do ICH para a determinação de impurezas, nas quais incluem seletividade, linearidade, exatidão, precisão, limites de quantificação e de detecção, e robustez. Os limites de quantificação foram de 0,479; 0,0606 e 0,133  $\mu$ g/mL para as impurezas C, D e E, respectivamente. Deste modo, os métodos validados foram aplicados em amostras de iodixanol. Os resultados para a análise de impurezas e teor nestas amostras são, portanto, apresentados e discutidos.

## ABSTRACT

### ANALYTICAL METHOD DEVELOPMENT BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR DETERMINATION OF IMPURITIES IN IODIXANOL

This work describes for the first time an isocratic method in a single analytical run to quantify deacetyl iodixanol (iodixanol related compound C), iopentol (iodixanol related compound D) and cyclized iodixanol (iodixanol related compound E), as impurities in iodixanol. Iodixanol is a drug substance, dimeric, nonionic, water-soluble, used as a radiographic contrast medium, which is administered by intravascular injection. The impurities A and B were not evaluated in this work, since they are not commercially available as standards. The method was also validated for the quantitative assay, since there is no chromatographic method described in the current USP compendium for the assay. The impurities can be formed during the synthesis process of iodixanol, and it is important to quantify them due to their related toxicity. In this work, the reverse and hydrophilic interaction (HILIC) modes of elution were evaluated. The hydrophilic elution mode was selected due to good efficiency and selectivity. In both modes of elution, columns having the technology fused-core were used, since they demonstrate high efficiency due to their better mass transfer in comparison to conventional HPLC columns. The chromatographic separation was carried out on a kinetex® HILIC column (150 x 4.6 mm; 2.6  $\mu\text{m}$ ) at 20 °C using acetonitrile-formic acid (pH 3.2; 1.0  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (92:08, v/v) at a flow rate of 0.8 mL/min. The compounds were monitored at 243 nm and the total time of analysis was 45 min. The method was validated in accordance with the current ICH guidelines for determination of impurities which include selectivity, linearity, accuracy, precision, limits of quantification and detection and robustness. The limits of quantification (LOQ) were 0.479; 0.0606 and 0.133  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for the impurities C, D and E, respectively. Furthermore, the validated methods were tested in iodixanol samples. The test results of the analyses of impurities and assay in those samples are presented and discussed accordingly.

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	Iodixanol .....	1
1.1.1.	Estrutura e estereoisômeros do iodixanol .....	2
1.2.	Impurezas do iodixanol.....	4
1.2.1.	Desafios analíticos para quantificação de impurezas.....	8
1.3.	Ortogonalidade .....	10
1.4.	Cromatografia por interação hidrofílica (HILIC) .....	18
1.5.	Colunas de cromatografia líquida de tecnologia núcleo fundido (fused-core)... .....	21
1.6.	Validação do método analítico.....	23
2.	OBJETIVOS .....	25
3.	PARTE EXPERIMENTAL .....	26
3.1.	Generalidades .....	26
3.2.	Preparo das amostras para a análise de impurezas conhecidas.....	28
3.2.1.	Preparo das soluções utilizadas na validação de impurezas .....	28
3.2.2.	Preparo das soluções utilizadas na aplicação do método de impurezas .....	33
3.3.	Preparo das amostras para a análise de teor .....	35
3.3.1.	Preparo das soluções utilizadas na validação de teor.....	36
3.3.2.	Preparo das soluções utilizadas na aplicação do método de teor.....	37
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	39
4.1.	Desenvolvimento do método .....	39
4.2.	Otimização do método .....	41
	Temperatura da coluna .....	42
	Modificador orgânico .....	43
	Aditivos e pH .....	45
	Força iônica.....	47
	Proporção fase móvel.....	48
	Vazão .....	49

Método final.....	50
4.3. Validação do método analítico.....	51
4.3.1. Validação do método analítico de impurezas conhecidas.....	52
Adequabilidade de sistema .....	53
Seletividade.....	54
Linearidade.....	56
Precisão e Exatidão .....	60
Robustez do método e estabilidade de soluções analíticas .....	62
4.3.2. Validação do método analítico de teor de iodixanol .....	64
Adequabilidade de sistema .....	65
Seletividade.....	66
Linearidade.....	66
Precisão e Exatidão .....	69
Robustez do método e estabilidade de soluções analíticas .....	70
4.4. Aplicação dos métodos.....	72
5. CONCLUSÕES.....	77
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	78

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Iodixanol

Iodixanol, 5,5'-[(2-hydroxy-1,3-propanediyl)bis (acetylimino)]bis[N,N'-bis(2,3-dihydroxypropyl)-2,4,6-triiodo-1,3-benzenedicarboxamide], é um agente dimerico, não-iônico, solúvel em água, composto organiodado e usado para contraste para raios X com administração intravascular. Injeções intravasculares de iodixanol tornam opacas as vias sanguíneas no caminho de seu fluxo, facilitando a visualização radiográfica de estruturas internas do corpo humano até a ocorrência de diluições e eliminações. <sup>1</sup>

Os agentes de contraste de raios X geralmente contêm átomos pesados, como iodo, que absorvem a radiação, e apresentam grupos hidrofílicos, como ácidos carboxílicos, carboxamidas ou grupos hidroxilas, para permitir boa solubilidade em água. O tipo de grupo hidrofílico permite a classificação de compostos aromáticos triodatados como agentes de contraste iônico (primeira geração) ou não-iônico (segunda geração). Agentes de contraste de raios X de terceira geração, como o caso do iodixanol, são compostos dímeros não-iônicos aromáticos triodatados. São usados como soluções isotônicas e isoosmóticas com o sangue. <sup>2</sup>

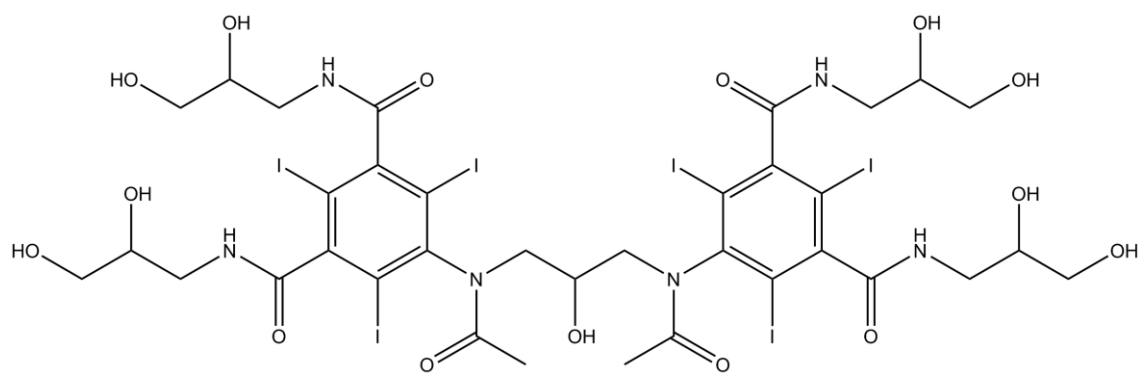
Uma solução é considerada isosmótica quando possui uma concentração de solutos por unidade de volume igual à solução padrão (ou de referência; neste caso o sangue), independentemente da natureza do soluto. Isotonia é um estado de equilíbrio osmótico entre dois meios separados por um tipo qualquer de fronteira. Neste caso, a solução isotônica tem a mesma concentração de soluto dentro e fora da célula, ou seja, a concentração extracelular de solutos incapazes de atravessar a membrana plasmática é igual à intracelular, não havendo variação do volume celular. <sup>3</sup>



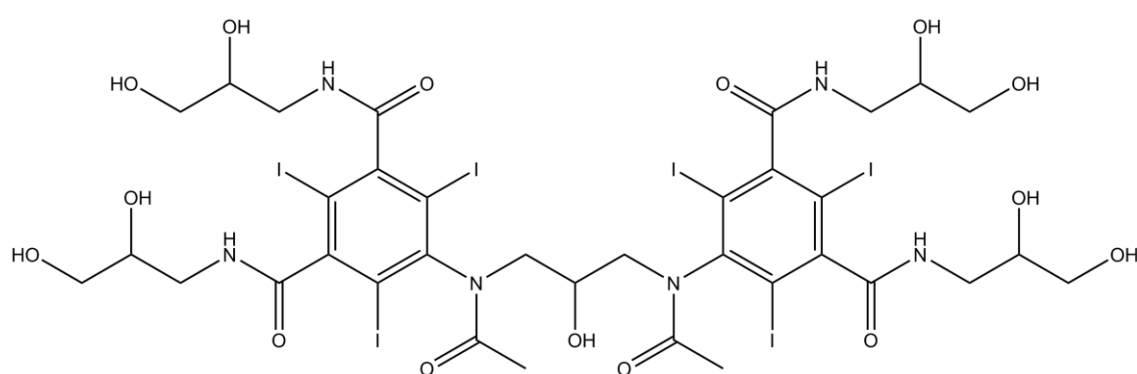
### 1.1.1. Estrutura e estereoisômeros do iodixanol

O iodixanol é comercializado sendo composto por uma mistura de três estereoisômeros, em que os três possuem atividade farmacológica (FIGURA 1.1). Os três estereoisômeros podem ser resolvidos por cromatografia líquida no modo reverso de eluição: *exo-exo*, *exo-endo*, e *endo-endo* que, em equilíbrio à temperatura ambiente, constituem a mistura estereoisomérica em, aproximadamente, 60, 37 e 3%, respectivamente. <sup>4</sup>

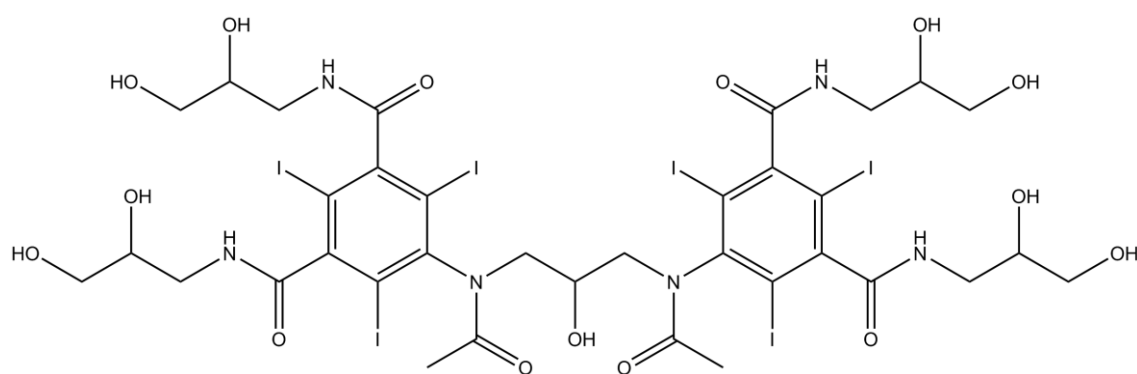
As palavras *endo* e *exo* são utilizadas para indicar uma estereoquímica relacionada às dos compostos bicíclicos como os norboranos. Um substituinte em uma ponte é denominado *exo* se ele for *anti (trans)* em relação à maior das outras duas pontes, e recebe a denominação *endo* se for *sin (cis)* em relação à maior das outras duas pontes. <sup>5</sup>



Iodixanol isômero exo-exo



Iodixanol isômero exo-endo



Iodixanol isômero endo-endo

FIGURA 1.1: Estrutura molecular do iodixanol e os respectivos estereoisômeros exo-exo, exo-endo, e endo-endo.

## 1.2. Impurezas do iodixanol

As impurezas do Iodixanol têm origem no processo de síntese ou degradação do mesmo. Três eventuais impurezas que podem ser formadas, e foram estudadas por PRIEBE et. al, <sup>2</sup> são: N-acetil iodixanol ciclizado, deacetil iodixanol (composto relacionado C) e iodixanol ciclizado (composto relacionado E). Suas estruturas moleculares estão representadas respectivamente nas FIGURAS 1.2 a 1.4.

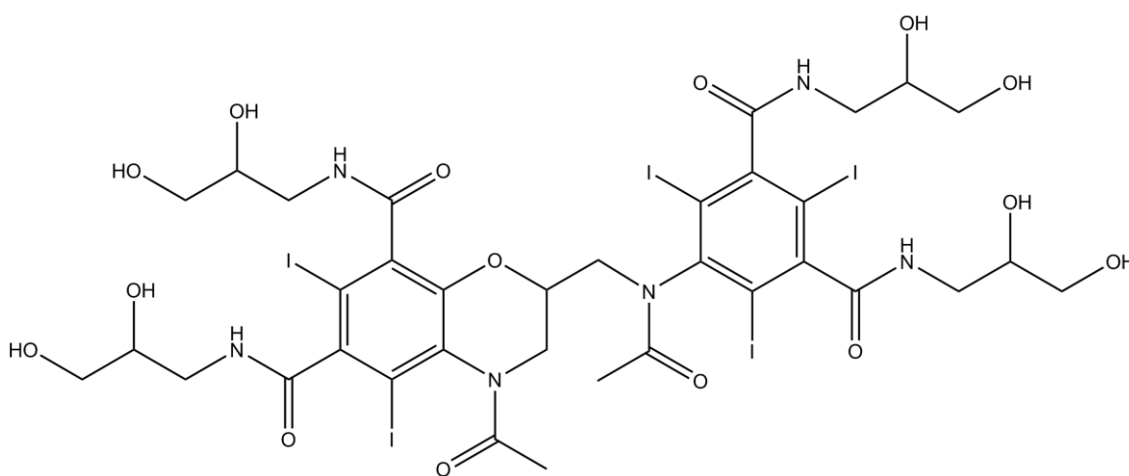


FIGURA 1.2: Estrutura molecular do N-acetil iodixanol ciclizado

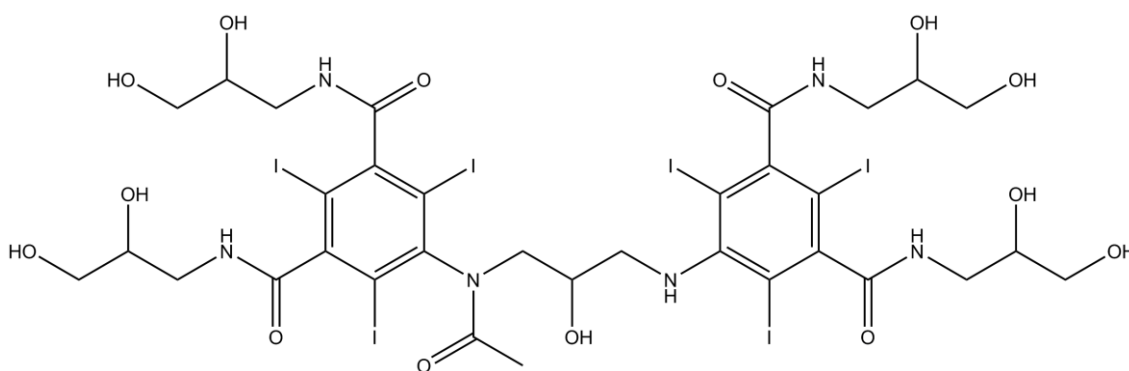


FIGURA 1.3: Estrutura molecular do deacetil iodixanol (composto relacionado C)

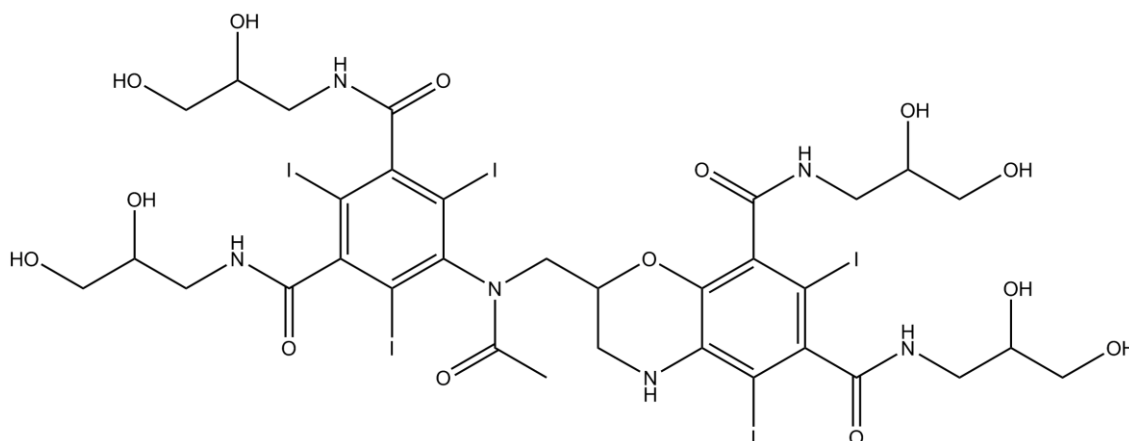


FIGURA 1.4: Estrutura molecular do iodixanol ciclizado (composto relacionado E)

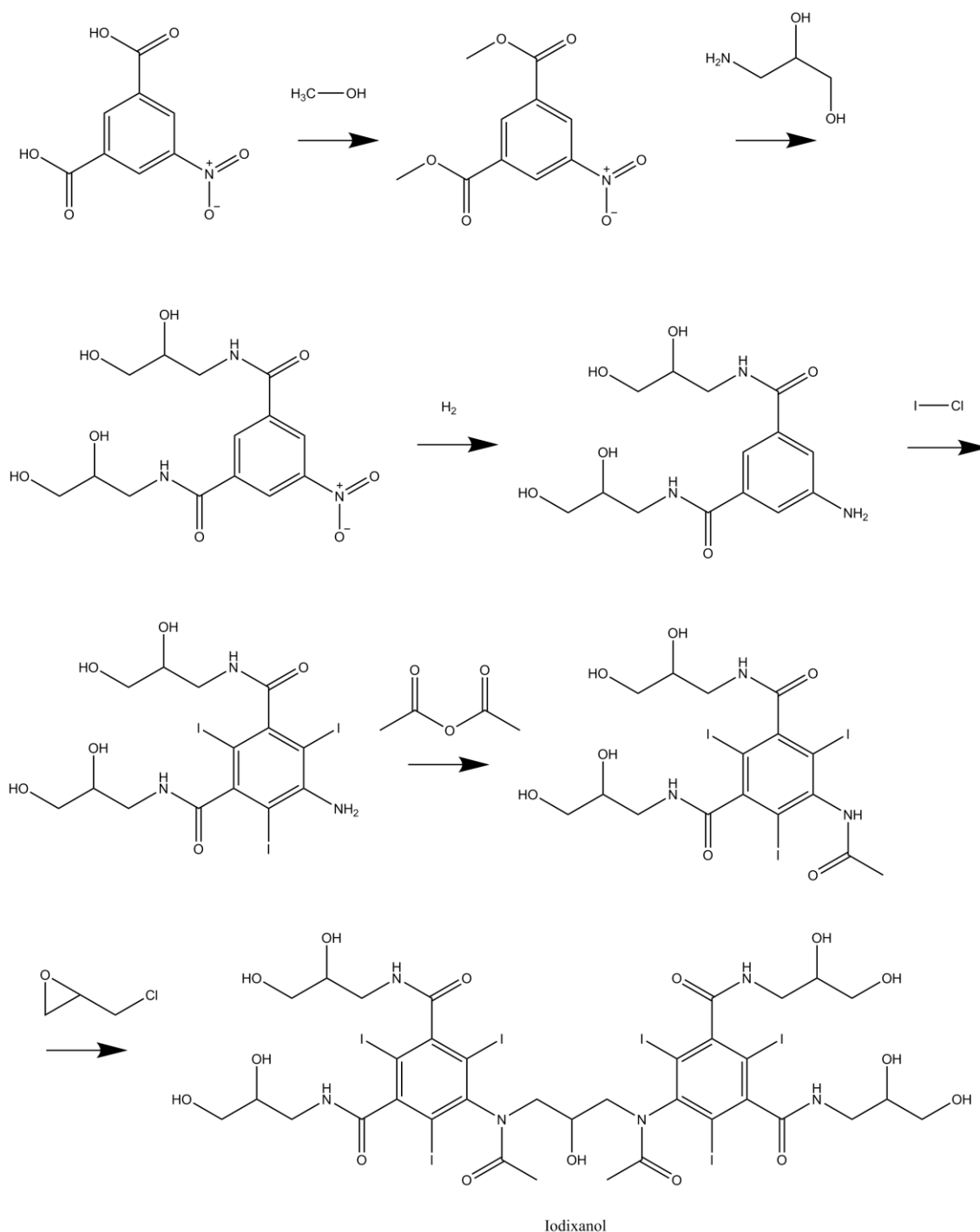
A perda parcial de ácido acético de iodixanol pode geralmente ocorrer sob condições de hidrólise ou solvólise para formar deacetil iodixanol.

PRIEBE et. al.<sup>2</sup> relatou que N-acetil iodixanol ciclizado é formado quando iodixanol é exposto a condições básicas em temperaturas elevadas ou à temperatura ambiente, por exemplo, quando uma solução de iodixanol é deixada em contato por muito tempo com uma resina fortemente básica de troca iônica. Sob as condições de sua formação, N-acetil iodixanol ciclizado é essencialmente desacetilado e forma iodixanol ciclizado. Esta segunda reação diminui drasticamente a concentração de N-acetil iodixanol ciclizado remanescente e torna necessária uma abordagem diferente de síntese.

Devido à baixa concentração de N-acetil iodixanol ciclizado remanescente do processo de síntese de Iodixanol, esta impureza não foi quantificada pelo método analítico desenvolvido neste projeto.

Em contrapartida, em outro artigo publicado posteriormente por PRIEBE et. al.,<sup>6</sup> foi relatado que mesmo sob condições extremamente ácidas ou básicas, iodixanol é estável. Menos de 1% de iodixanol se decompõe sob condições básicas (pH 11, 20 °C, 5 dias), condições ácidas (pH 0,4, 80 °C, 5 dias), em soluções aquecidas (140 °C, 2 dias) e na presença de oxigênio (pressão atmosférica, 100 °C, 3 dias), indicando alta estabilidade química.

Na patente número 6974882<sup>7</sup> está descrita a rota de síntese proposta e apresentada no ESQUEMA 1.1.



ESQUEMA 1.1: Esquema reacional de síntese de iodixanol descrito na patente número 6974882

Outra impureza que pode ser formada no processo de síntese do iodixanol, na presença de metanol em meio alcalino (pH 11,5), é o iopentol (composto relacionado D; FIGURA 1.5). Na patente número 5840967<sup>8</sup> está descrita a rota de síntese proposta e apresentada no ESQUEMA 1.2.

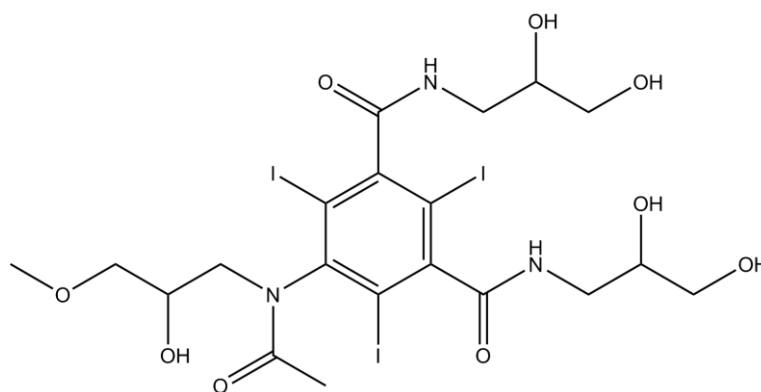
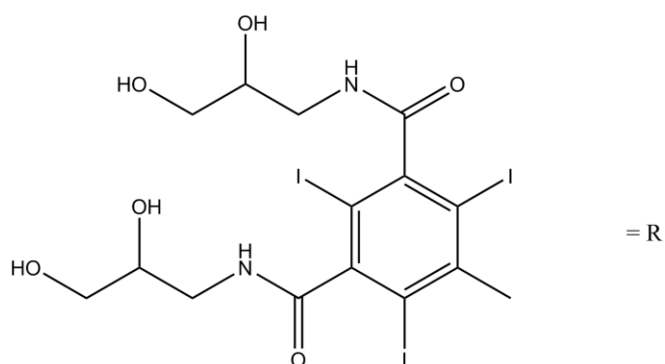
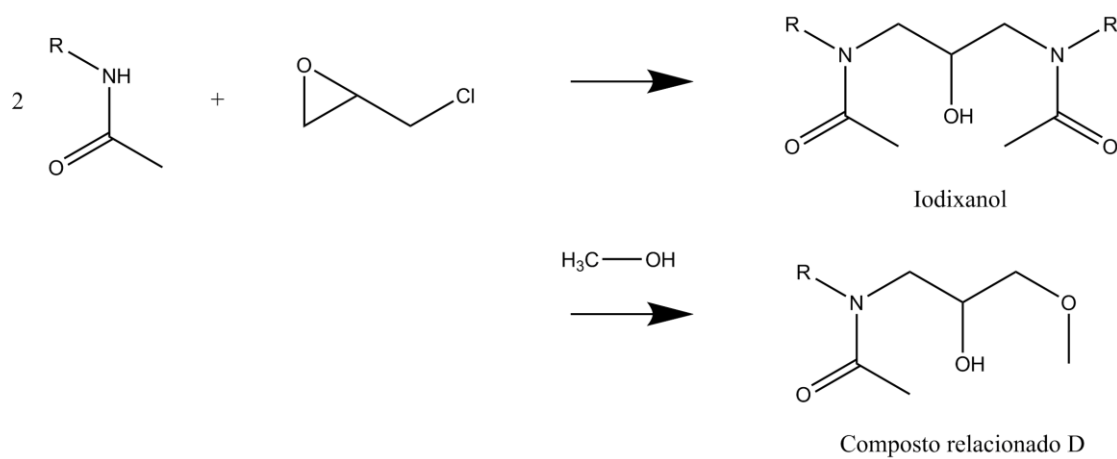


FIGURA 1.5: Estrutura molecular do iopentol (composto relacionado D)



ESQUEMA 1.2: Proposta de formação do iopentol (composto relacionado D), como subproduto no final do processo de síntese de iodixanol.

### 1.2.1. Desafios analíticos para quantificação de impurezas

Uma revisão dos artigos publicados para quantificação/análise de iodixanol demonstrou que os trabalhos, em sua maioria, envolvem cromatografia líquida no modo reverso de eluição, e colunas cromatográficas de fase estacionária de octadecilsilano (C18). Algumas referências citam o uso de colunas aminopropilsilano (NH<sub>2</sub>), sendo esta também utilizada no método analítico atual da USP36 – NF31.

Apenas um artigo descreve a análise de dois dos compostos formados durante a síntese de iodixanol: deacetil iodixanol (composto relacionado C) e iodixanol ciclizado (composto relacionado E).<sup>2</sup> O modo de eluição usado foi o modo reverso com colunas de octadecilsilano (C18) e aminopropilsilano (NH<sub>2</sub>). A impureza iopentol (composto relacionado D) não é descrita neste artigo.

CHITNIS e AKHLAGHI<sup>9</sup> desenvolveram um método simples, robusto e rápido para quantificação de iodixanol em plasma humano por cromatografia líquida. Neste método, foi utilizada a coluna cromatográfica C18 EPS (Alltech Associates; 3 µm; 150 × 4.6 mm), empregando eluição gradiente com fase móvel composta de solução tampão a 0,1% de formiato de sódio de pH 7,4 (solvente A) e acetonitrila como solvente B, com detecção UV. Embora Iodixanol exista em três formas isoméricas, a composição de fase móvel no gradiente foi ajustada de modo que os três estereoisômeros fossem co-eluídos em uma única banda cromatográfica em torno de 9,3 min de tempo de retenção.

DENIS et. al<sup>10</sup> também quantificaram iodixanol em plasma humano, empregando eluição gradiente, com fase móvel composta de ácido fórmico a 0,1% (A) e acetonitrila (B). Espectrometria de massa foi empregada para detecção. Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies; 5 µm; 150 mm × 4,6 mm) foi a coluna analítica utilizada.

JACOBSEN et. al<sup>4</sup> utilizaram a coluna Brownlee Spheri-5 RP-18 (Applied Biosystems; 5 µm; 250 × 4,6 mm), empregando eluição gradiente com fase móvel composta de água (A) e acetonitrila (B), com detecção UV. Variações na força da fase móvel e adições de metanol ou tetraidrofurano foram testadas para otimizar as separações. O iodixanol foi quantificado em plasma, urina e fígado de ratos da

espécie *Sprague-Dawley*, de cachorros da espécie *Beagle* e de macacos da espécie *Cynomolgus*.

PRIEBE et. al.<sup>2</sup> quantificaram os subprodutos provenientes da síntese de iodixanol: N-acetil iodixanol ciclizado, deacetil iodixanol (composto relacionado C) e iodixanol ciclizado (composto relacionado E), com dois métodos analíticos diferentes. Um dos métodos utilizando a coluna Brownlee OD-5A (Brownlee Labs; 5 µm; 250 mm × 4.6 mm), empregando, como nos casos anteriores, eluição gradiente com fase móvel composta de água (A) e acetonitrila (B), com detecção UV; e outro método com a coluna Supelcosil LC-NH2 (Supelco; 5 µm, 250 mm × 4,6 mm), empregando eluição gradiente com fase móvel composta de água e acetonitrila, com detecção UV.

O desafio analítico que justifica o desenvolvimento de métodos para estes compostos é que a USP 36 preconiza dois métodos distintos para analisar as impurezas conhecidas C, D e E. Os métodos utilizam o modo reverso de eluição, com eluição gradiente, para o método 1 é utilizado uma coluna analítica do tipo C18 e no método 2 uma coluna do tipo amino. Os problemas destacados nestes métodos são que ambos apresentam bandas mal resolvidas nas condições descritas (perda de seletividade), ilustrado nos cromatogramas das FIGURAS 1.6 e 1.7. Outra característica negativa dos mesmos é que o modo gradiente não é indicado para compostos com fatores de retenção próximos.

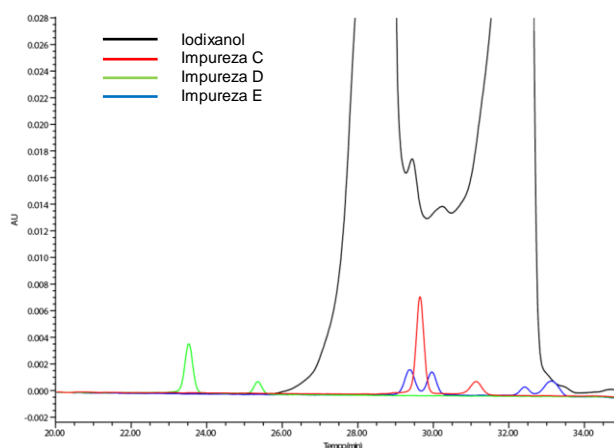


FIGURA 1.6: Cromatograma representativo do método 1 de impurezas descrito na USP 36.



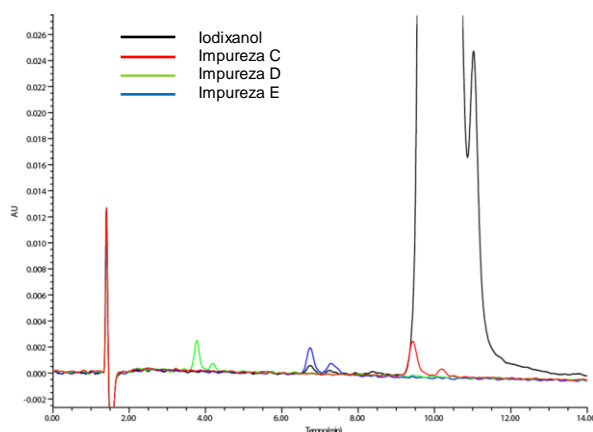


FIGURA 1.7: Cromatograma representativo do método 2 de impurezas descrito na USP 36.

Devido à mistura de estereoisômeros presente nesses compostos, nos cromatogramas do iodixanol e de suas impurezas C, D e E é possível observar mais de um pico para cada um deles. Em relação às demais impurezas do iodixanol, a impureza A não está descrita no método compendial da USP 36; e a impureza B [5-(acetilamino)-N,N'-bis(2,3-dihidroxypropyl)-2,4,6-triiodo-1,3-benzenedicarboxamide], apesar de descrita na USP 36 como impureza, não é disponibilizada como padrão farmacopeico. Portanto, ambas as impurezas A e B não foram avaliadas no presente trabalho.

Neste trabalho foi também desenvolvido e validado um método para quantificação de teor da matéria prima iodixanol. A justificativa para este método é que o descrito no compêndio da USP 36 é um método de titulação potenciométrica, apesar de existirem métodos publicados onde a quantificação de iodixanol em matrizes biológicas é efetuada por cromatografia líquida.

### 1.3. Ortogonalidade

“Ortogonalidade” é um termo utilizado em cromatografia na aplicação de métodos que apresentam diferenças significativas de seletividade.<sup>11</sup> Métodos “ortogonais” são frequentemente aplicados com o intuito de se obter uma melhora

em seletividade. Diversos parâmetros cromatográficos podem ser alterados e assim bandas com co-eluições são resolvidas. As co-eluições podem estar presentes tanto durante o desenvolvimento de um método como em uma análise de rotina. Em ambos os casos, o objetivo é alcançar uma separação ortogonal e atestar esta possibilidade.<sup>12</sup> Podemos citar os métodos ortogonais descritos, por exemplo, na identificação e quantificação de solventes residuais da USP 36.<sup>13</sup>

Com a finalidade de se avaliar a seletividade como objetivo principal, primeiramente, mudanças efetivas do método considerado “ortogonal” devem ser amplas na nova condição cromatográfica avaliada. Em segundo lugar, o método “ortogonal” final deve prover separação satisfatória de todas as bandas provenientes da amostra (resolução linha de base, idealmente  $R_S > 1,5$ , calculado de acordo com a EQUAÇÃO 1.1).

$$R_S = \left(\frac{1}{4}\right) \times (\alpha - 1)N^{1/2} \times \left[\frac{k}{(1 + k)}\right]$$

EQUAÇÃO 1.1: Resolução entre dois picos adjacentes, onde  $\alpha$  é o fator de separação,  $N$  é eficiência da coluna, e  $k$  é o fator de retenção da primeira banda.<sup>11</sup>

O termo “ortogonalidade” é também utilizado em outras áreas científicas, que podem ser sumarizados da forma a seguir.

Em matemática, é descrito como a propriedade que dois vetores possuem quando são perpendiculares um ao outro. Cada vetor avança indefinidamente no espaço, nunca se cruzando. Já em estatística, de maneira simplificada, define dois conjuntos de variáveis que são estatisticamente independentes. Analogamente, o termo aplicado em cromatografia é definido de forma que existam diferentes condições entre dois métodos distintos, onde os tempos de eluição/retenção podem ser tratados estatisticamente de maneira independente, alcançando diferenças significativas de seletividade e na interação soluto – fase móvel/fase estacionária.<sup>14; 15</sup>

Uma variedade de métricas tem sido usada para determinar o grau de ortogonalidade, de modo simples, métodos ortogonais são aqueles onde os

compostos apresentam diferenças significativas em tempos de eluição, de modo que atinjam os seguintes objetivos: <sup>12</sup>

- i. Melhoria de resolução
- ii. Expor bandas co-eluídas
- iii. Cromatografia em duas dimensões (2D)

Diversas condições experimentais podem afetar a seletividade, como resumido na TABELA 1.1. As primeiras cinco variáveis são eficazes para qualquer tipo de amostra, neutra ou ionizada, enquanto que as variáveis de seis a nove afetam principalmente a seletividade para as amostras que contêm compostos ionizáveis (ácidos ou bases). Como em alguns casos as amostras não apresentam compostos ionizáveis, ou a composição da mesma não pode ser completamente conhecida, um procedimento geral para o desenvolvimento de um método “ortogonal” pode ser aplicado, baseando-se principalmente nas primeiras cinco variáveis. <sup>11</sup>

TABELA 1.1: Condições experimentais que afetam seletividade em cromatografia no modo reverso. As condições de 1 a 5 são consideradas efetivas para qualquer tipo de amostra, enquanto que as de 6 a 9 afetam a seletividade de compostos ionizáveis.<sup>11</sup>

<b>Condição</b>	
1.1	Concentração de solvente (%B)
2.1	Eluição gradiente
a.	Inclinação do gradiente
3.1	Temperatura
4.1	Modificador orgânico
a.	Acetonitrila
b.	Metanol
c.	Tetraidrofurano (THF)
5.1	Coluna (fase estacionária)
6.1	pH da fase móvel
7.1	Composição química da solução tampão / concentração
8.1	Aditivos (aminas)
9.1	Reagentes de pareamento iônico

A maneira clássica de se conseguir diferenças em seletividade é, efetuando-se alterações nas composições de fase móvel, sendo o mais usual realizar através da mudança de tipo de solventes.

O triângulo da seletividade como delineado por SNYDER et. al..<sup>16; 17; 18</sup> é usado para alterar os modificadores orgânicos da fase móvel, e assim obter-se uma melhoria no espaçamento das bandas.

No modo reverso, a alteração da seletividade do solvente é afetada pela força do mesmo e também por outras características como, por exemplo, de um solvente ácido para um básico ou com interações de dipolo.

Outro estudo que pode ser conduzido no modo reverso de eluição é através da seleção de fase estacionária de acordo com o critério de comparação de

seletividade de colunas descritas por MARCHAND et. al. <sup>19</sup> Os parâmetros no modo reverso de eluição são determinados por cinco características:

- hidrofobicidade (H),
- resistência estérica (S\*),
- acidez (A) de ligação de hidrogênio (H-B),
- basicidade (B) de ligação de hidrogênio (H-B),
- capacidade de troca catiônica (C)

Esses cinco parâmetros afetam diretamente a seletividade no modo reverso de eluição estão ilustrados na FIGURA 1.8, adaptado do trabalho de MARCHAND et.al. <sup>20</sup> As interações  $\pi$ - $\pi$  e dipolo-dipolo estão também ilustradas nessa figura.

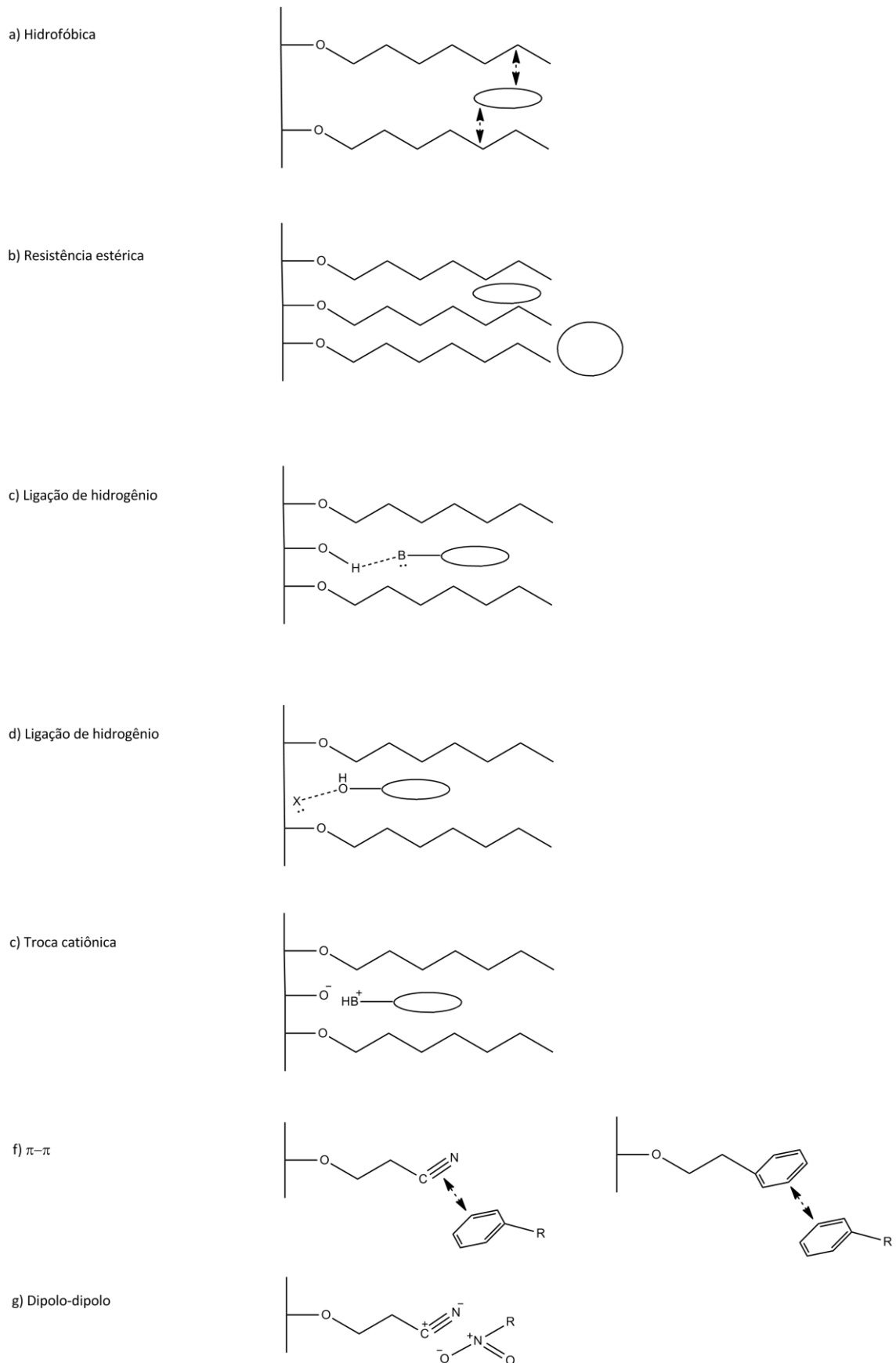


FIGURA 1.8: Ilustrações de diversos tipos de interações analito-fase estacionária no modo reverso, modificada de MARCHAND et.al.<sup>20</sup>

A diferença na seletividade entre duas colunas de alquisilano podem ser descritas em termos da EQUAÇÃO 1.2 através da função  $F_S$ , que é igual à distância ponderada entre duas colunas 1 e 2, cujos valores de  $H$ ,  $S^*$ , etc, são traçados em 5 dimensões: <sup>19</sup>

$$F_S = \{[12,5(H_2 - H_1)]^2 + [100(S_2^* - S_1^*)]^2 + [30(A_2 - A_1)]^2 + [143(B_2 - B_1)]^2 + [83(C_2 - C_1)]^2\}^{1/2}$$

EQUAÇÃO 1.2: Função de distância ponderada entre duas colunas 1 e 2, cujos valores de  $H$ ,  $S^*$ ,  $A$ ,  $B$ ,  $C$ , são plotados em cinco dimensões.

Duas colunas que, em comparação, apresentarem menores valores de  $F$  (ou  $F_S$ ) possuem seletividade similar e devem, portanto, fornecer separações similares de determinada amostra nas mesmas condições cromatográficas; duas colunas com maiores valores de  $F$  serão muito diferentes em seletividade.

Diversos artigos atestaram as diferenças de seletividade com solutos ionizados e não ionizados, <sup>19; 21; 22; 23; 24; 25</sup> bem como o emprego apropriado dos parâmetros  $F$  e  $F(-C)$  para previsão de seletividade de fase para cada tipo de soluto. Para amostras com ambos os solutos ionizados e não ionizados, uma melhor previsão pode ser obtida utilizando estes dois parâmetros em conjunto. <sup>12</sup>

Com o intuito de se atingir a ortogonalidade, e tendo em mente as diferenças de seletividade a serem atingidas, são necessárias diversas condições cromatográficas para tal finalidade. O modelo descrito pela EQUAÇÃO 1.2 supracitada é atualmente a abordagem mais relevante para a caracterização de colunas para o modo reverso de eluição.

Os valores de  $F$  podem ser obtidos através da ferramenta de comparação disponível no site da *United States Pharmacopeia*, como podemos visualizar no exemplo da coluna de marca Zorbax Eclipse XDB-C18® na TABELA 1.2. <sup>26</sup> Ao selecionar a coluna desejada, o valor de  $F$  para esta é definida como 0 (zero) e as demais são comparadas em relação à mesma.

TABELA 1.2: Comparação de colunas através de valores de *F*, adaptada de *USP Column Equivalency Application – PQRI Database*.<sup>26</sup>

Classificação	<i>F</i>	Coluna	H	S*	A	B	C(2,8) [ <sup>1</sup> ]	C(7,0) [ <sup>1</sup> ]	Tipo [ <sup>2</sup> ]	Designação da USP [****]	Fabricante
0	0	Zorbax Eclipse XDB-C18	1,077	0,024	-0,063	-0,033	0,055	0,088	B	L1	Agilent
1	0,95	Ultra II C18	1,041	0,021	-0,037	-0,015	0,264	0,181	B	L1	Restek
2	1,17	Kromasil 100 5 C18	1,051	0,035	-0,07	-0,022	0,039	-0,057	B	L1	Akzo Nobel
3	1,2	Pinnacle DB C18	1,014	0,025	-0,033	-0,005	0,364	0,28	A	L1	Restek
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
78	2.94	Halo C8	0.913	0.028	-0.132	-0.008	-0.011	0.188	B	L7	Advanced Materials Technology
79	3.03	Kinetex C18 100A	0.963	0.009	-0.137	-0.011	0.007	0.125	B	L1	Phenomenex
80	3.05	LaChrom C18	0.993	0.013	-0.151	-0.006	-0.278	-0.12	B	L1	Hitachi High-Tech
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
363	9.7	Prevail Select C18	0.822	0.029	-0.368	0.141	-1.057	0.455	B	L1	Grace/Alltech
364	9.74	Acclaim Polar Advantage	0.855	-0.068	-0.116	0.023	-0.27	0.357	EP	L60	Dionex
365	9.8	Alltima HP C18 High Load	1.08	-0.066	0.066	-0.04	-0.322	-0.244	B	L1	Grace/Alltech
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
629	32.35	BioBasic Phenyl	0.493	-0.233	-0.671	0.217	0.014	0.39	phenyl	L11	Thermo/Hypersil
630	36.65	Microsorb-MV 100 CN	0.357	-0.241	-0.852	-0.029	0.148	0.785	CN	L10	Agilent/Varian
631	43.99	Inertsil ODS-EP	0.8	0.06	-1.52	0.05	-0.62	-0.07	EP	L60	GL Sciences

Legenda: *F* = Função de distância ponderada entre duas colunas, H = hidrofobicidade, S\* = resistência estérica, A = acidez de ligação de hidrogênio, B = basicidade de ligação de hidrogênio, C = capacidade de troca catiônica.

[<sup>1</sup>]: os valores entre os parênteses refletem o pH em qual são efetuadas as medidas de C.

[<sup>2</sup>]: tipo de coluna avaliada. A = baseada em sílica gel convencional (mais ácida); B = baseada em sílica gel ultrapura; EP = fase com um grupo polar inserido; *phenyl* = fenil; CN = ciano

[\*\*\*\*]: classificação de colunas de acordo com a fase estacionária do compêndio da USP 36: L1 = octadecilsilano (C18); L7 = octilsilano (C8); L10 = ciano (CN); L11 = fenil; L60 = alquilamida.<sup>27</sup>

Um valor de *F* menor ou igual a 3 significa “equivalente” seletividade de colunas em quase todos os casos, enquanto um valor de *F* entre 3 e 10 sugere que as duas colunas são apenas satisfatoriamente semelhantes para a separação de diversas amostras. Valores de *F* maiores que 10 significam que duas colunas possuem seletividades distintas.<sup>19</sup>



A mudança do modo de eluição, uma vez promovendo mudanças drásticas de fase estacionária e fase móvel, pode também ser utilizada com o intuito de propiciar alterações na seletividade e o propósito de atingir a ortogonalidade.

#### 1.4. Cromatografia por interação hidrofílica (HILIC)

O modo de eluição normal em cromatografia líquida é um modo em que a fase estacionária é mais polar do que a fase móvel. O termo fase normal é utilizado para distinguir do modo de eluição de fase reversa, em que a fase estacionária é menos polar do que a fase móvel. O modo de eluição por interação hidrofílica, ou simplesmente HILIC (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*), é um modo de eluição distinto, tendo em comum com o modo de eluição normal o fato de utilizarem fases estacionárias polares, sendo inclusive utilizado para a separação de compostos muito polares, com fatores de log P (coeficiente de partição em sistema de água/octanol, EQUAÇÃO 1.3) negativos.<sup>28</sup>

$$\log P_{\text{Octanol/água}} = \log \left( \frac{[\text{solute}]_{\text{Octanol}}}{[\text{solute não ionizado}]_{\text{água}}} \right)$$

EQUAÇÃO 1.3: log P (coeficiente de partição em sistema de água/octanol)

Uma das grandes vantagens do modo de eluição por interação hidrofílica é o fato de ser indicado quando se utiliza o detector de espectrometria de massas (LC/MS), uma vez que são utilizadas altas concentrações de solventes orgânicos e baixas concentrações de soluções aquosas, facilitando a evaporação/ionização de analitos, e de alta compatibilidade com a técnica supracitada.<sup>29</sup> Do mesmo modo, o modo HILIC é citado em diversas referências com aplicação em LC/MS.<sup>29; 30; 31; 32</sup>

O mecanismo de separação do modo HILIC foi primeiramente comparado ao modo normal eluição por motivos históricos. Entretanto, estudos recentes revelaram que o HILIC é considerado mais complexo que o modo normal.

<sup>33</sup> O mecanismo de retenção para o modo de eluição por interação hidrofílica é

sugerido como uma partição do analito entre o eluente e uma camada rica em água, parcialmente imobilizada na fase estacionária. <sup>34</sup> As FIGURAS 1.9 e 1.10 ilustram o mecanismo sugerido.

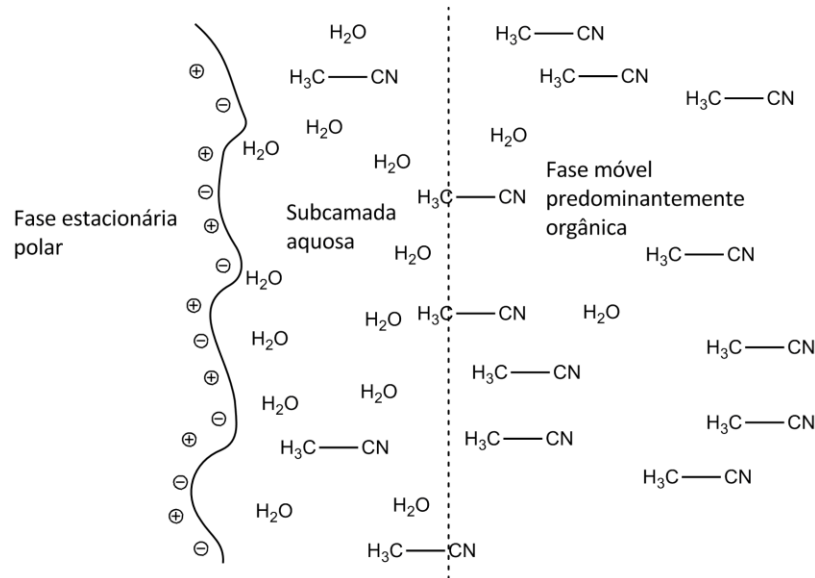


FIGURA 1.9: Representação gráfica do micro ambiente ao redor da superfície da fase estacionária no modo por interação hidrofílica, modificada de *SIELC – HILIC*. <sup>28</sup>

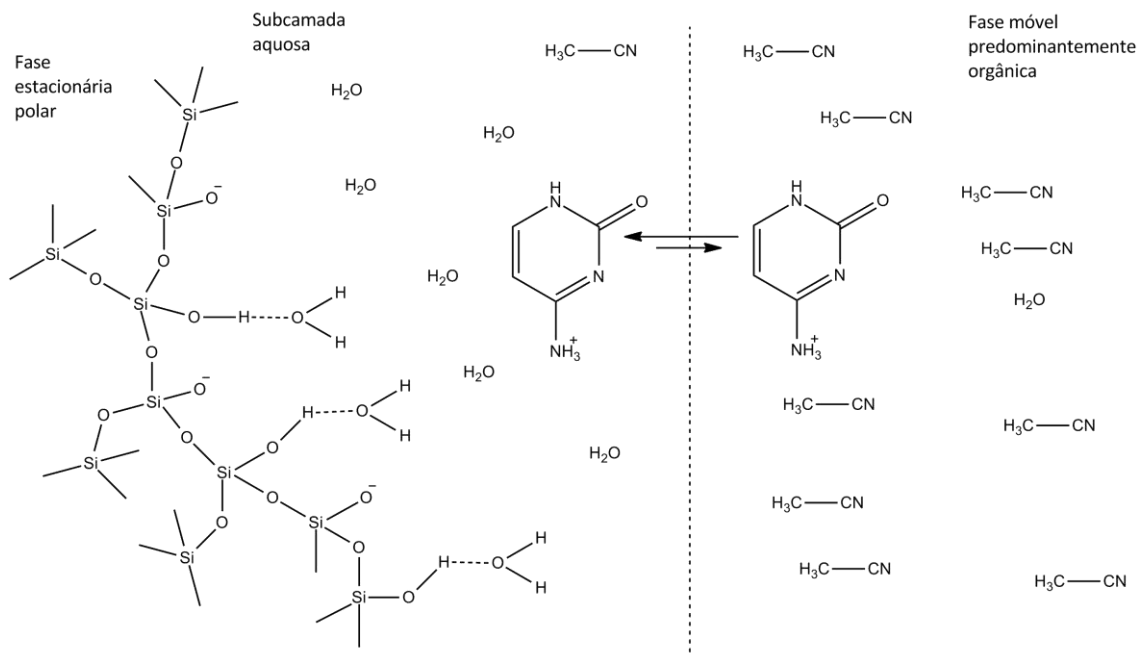


FIGURA 1.10: Ilustração de interação analito/fase estacionária no modo por interação hidrofílica, modificada de *Waters – Atlantis HILIC columns*. <sup>35</sup>

DINH et. al.<sup>36</sup> inferiu em seu estudo que o mecanismo dominante no modo de eluição por interação hidrofílica é o de partição, sendo a troca iônica um poderoso fator de seletividade. Este último pode ser utilizado simultaneamente com o conteúdo de água, e também combinado a diferentes concentrações de eletrólitos para avaliação da retenção de solutos ionizáveis.

Artigos recentes publicados sobre o modo de eluição por interação hidrofílica têm relatado que colunas clássicas de sílica e do tipo amino são limitadas pela escolha dos analitos, devido aos fenômenos de forte adsorção de compostos com funcionalidades específicas. Entretanto, colunas de sílica não derivada ainda são as mais utilizadas como fase estacionária neste modo, apesar do surgimento de diversos outros tipos de fases, citados a seguir.<sup>36; 37; 38</sup>

Colunas de sílica de base polimérica apresentam boa retenção para uma ampla variedade de analitos, porém pobre eficiência de separação. Colunas do tipo amida também apresentam boa retenção para uma ampla variedade de analitos, e apresentam boa eficiência com tamanhos de partícula reduzidos (3µm) para compostos altamente polares. Colunas com grupo funcional sulfoalquilbetaina podem ser utilizadas na separação de vários analitos, mas a vazão otimizada é relativamente mais baixa se comparada com as demais, e assim sendo não adequada para cromatografia rápida. Colunas do tipo ciano e diol também podem ser utilizadas no modo por interação hidrofílica, entretanto, necessitam um maior estudo dos compostos a serem analisados. Finalmente, colunas do tipo monolito não apresentaram separações eficientes no modo por interação hidrofílica.

Em determinadas condições de testes, as colunas utilizadas no modo HILIC se encaixaram em quatro grupos funcionais em relação à sua seletividade principal, apresentado na TABELA 1.3.<sup>36</sup>

TABELA 1.3: Classificação de colunas utilizadas no modo HILIC em relação à seletividade principal.

<b>Seletividade principal</b>	<b>Grupo funcional da coluna</b>
Troca catiônica	sílica não modificada
Troca aniônica	colunas com funcionalidade amino
Dipolo-dipolo e múltiplas ligações de hidrogênio	sulfobetaina polimérica e similares
Interações pouco específicas	hidroxil, diol, amida, e anfotérico monomérico

### **1.5. Colunas de cromatografia líquida de tecnologia núcleo fundido (fused-core)**

As colunas que contém fase estacionária de tecnologia *fused-core* são desenvolvidas com partículas de tamanho reduzido, cerca de 2,7  $\mu\text{m}$  de diâmetro, consistindo de uma camada porosa de 0,5  $\mu\text{m}$  fundida a uma partícula sólida de 1,7  $\mu\text{m}$  de sílica no núcleo. Essas partículas apresentam eficiências comparáveis às partículas porosas de sub-2  $\mu\text{m}$ , entretanto apresentando pressões de retorno mais moderadas, devido à uniformidade de sua distribuição granulométrica. Desta forma, permitem uma melhor transferência de massa dos analitos se comparada com colunas convencionais (termo C na equação de van Deemter),<sup>39; 40; 41</sup> otimizando a difusão dos analitos, conforme ilustrado na FIGURA 1.11. Propicia-se, assim, alta eficiência em sistemas cromatográficos convencionais (HPLC ao invés de UHPLC), permitindo, inclusive, a operação em maiores vazões.<sup>40; 42</sup>

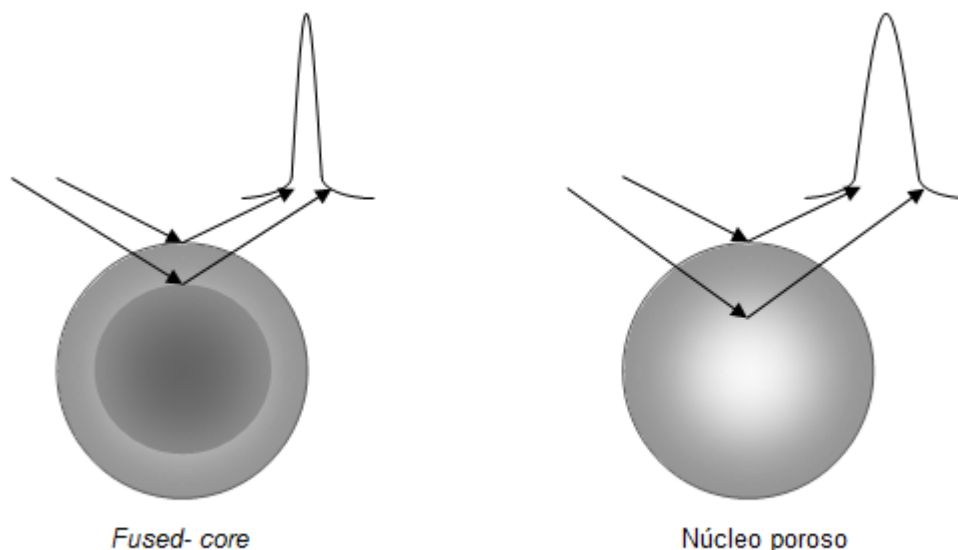


FIGURA 1.11: Ilustração da comparação da difusão de um analito entre colunas contendo partículas do tipo *fused-core* e convencionais (núcleo poroso), modificada de *Phenomenex - Kinetex 1.7 & 2.6 μm Core-Shell Technology*.<sup>42</sup>

SALISBURY<sup>40</sup> relatou uma comparação entre colunas de tecnologia *fused-core* de 2,7 μm e de partículas porosas de sub-2 μm. Os compostos selecionados como objeto de estudo foram um fármaco denominado de torcetrapibe e impurezas relacionadas ao mesmo, incluindo um diastereoisômero, de difícil separação. Foi reportado um método por cromatografia líquida convencional (HPLC), utilizando uma coluna de dimensões 100 x 4,6 mm, 2,7 μm de tamanho de partícula, e vazão de 2,75 mL/min, considerada elevada; entretanto, passível de escalonamento para uma vazão mais adequada de 1,0 mL/min, ao utilizar colunas de diâmetro 2,1 ou 3,0 mm, comercialmente disponíveis. O tempo final de análise do método foi de 5,0 min e a pressão de retorno da coluna analítica cerca de 4500 psi.

Na comparação com um sistema de UHPLC e coluna de dimensões 100 x 2,1 mm, 1,7 μm de tamanho de partícula totalmente porosa, um ganho na eficiência de coluna em cerca de 15% foi observado. Em contrapartida, um aumento de pressão de retorno de coluna em cerca de duas vezes maior foi reportado.

No estudo, foram, portanto, construídas curvas de van Deemter para efetuar uma comparação mais detalhada entre colunas porosas e as de *fused core*. Segundo SALISBURY<sup>40</sup>, a coluna *fused core* apresentou um formato de curva

similar aos de partícula porosa, e cerca de 80% de eficiência em comparação com as colunas sub-2  $\mu\text{m}$ . Entretanto, foi relatado pelo autor que as colunas de tecnologia *fused core* permitem separações eficientes mesmo em altas vazões sem sacrificar a resolução, apresentando também, como vantagem, alta robustez cromatográfica.

## 1.6. Validação do método analítico

A validação de um método analítico é definida como sendo o processo em que as características do mesmo são desafiadas a fim de satisfazer os requisitos de desempenho para as aplicações almejadas. Assim sendo, o objetivo da validação consiste em demonstrar que o método analítico proposto é adequado para a sua finalidade.<sup>43; 44</sup>

O método analítico proposto neste trabalho foi validado de acordo com as figuras de mérito descritas no capítulo geral da USP 36 <1225> *VALIDATION OF COMPENDIAL PROCEDURES* para quantificação de impurezas.<sup>44</sup> A USP 36 define quatro tipos de categorias e quais são as figuras de mérito específicas para cada classificação. No caso de quantificação de impurezas, o método analítico proposto é classificado na Categoria II – procedimentos analíticos para determinação de impurezas em princípios ativos ou compostos de degradação em produtos farmacêuticos acabados. As figuras de mérito são detalhadas na TABELA 1.4.

TABELA 1.4: Figuras de mérito requeridas de acordo com a categoria, adaptada de USP 36, *General Chapter: <1225> VALIDATION OF COMPENDIAL PROCEDURES*.

44

Figura de mérito	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio Limite		
Exatidão	Sim	Sim	— <sup>(*)</sup>	— <sup>(*)</sup>	Não
Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Seletividade	Sim	Sim	Sim	— <sup>(*)</sup>	Sim
Limite de detecção	Não	Não	Sim	— <sup>(*)</sup>	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	— <sup>(*)</sup>	Não
Linearidade	Sim	Sim	Não	— <sup>(*)</sup>	Não
Intervalo	Sim	Sim	— <sup>(*)</sup>	— <sup>(*)</sup>	Não
<sup>(*)</sup> Pode ser requerido, dependendo da natureza do teste em questão.					

Legenda:

Categorias: I – teor de ativos; II – impurezas: quantificação e ensaios limite; III – testes de performance (ex.: dissolução); IV – testes de identificação.

Dessa forma, as figuras de mérito avaliadas são: exatidão, precisão, seletividade, limite de quantificação, linearidade e intervalo. Mesmo não sendo requerida na USP 36, a figura de mérito de limite de detecção também foi avaliada no presente trabalho.

## 2. OBJETIVOS

Realizar o desenvolvimento e validação de um novo método analítico por cromatografia líquida para a análise de teor e de um novo método para a determinação de deacetil iodixanol, iopentol e iodixanol ciclizado, sendo as impurezas denominadas de composto relacionado C, composto relacionado D e composto relacionado E, respectivamente, na matéria prima iodixanol.

Aplicar os métodos desenvolvidos e validados de teor e determinação de impurezas supracitadas em diferentes lotes de matéria prima iodixanol.



### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. Generalidades

Todos os experimentos analíticos foram realizados nos laboratórios da United States Farmacopeia Brasil Ltda.

Os solventes orgânicos usados foram grau HPLC e foram adquiridos das empresas, respectivamente: acetonitrila, metanol, etanol e acetato de etila: Mallinckrodt Baker (St Louis, EUA); tetraidrofurano (THF): Sigma-Aldrich (St Louis, EUA).

A água usada para a fase móvel foi purificada através de um sistema Milli-Q (Millipore, São Paulo, Brasil). Os padrões de impurezas C, D e E e o padrão de iodixanol foi adquirido da United States Pharmacopeia (Rockville, EUA). Todos os outros reagentes foram de grau analítico, adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, EUA). As amostras de iodixanol foram adquiridas da United States Pharmacopeia (Rockville, EUA; lotes #1 e #2) e da Toronto Research Chemicals (North York, Canadá; lote #3).

As colunas analíticas avaliadas na primeira etapa do desenvolvimento, no modo reverso de eluição, de fases estacionárias C8; C18; fenil; fenil-hexil, pentafluorfenil, amino, e ciano, foram adquiridas das seguintes empresas: Thermo Fisher Scientific (Waltham, EUA); Sigma-Aldrich (St Louis, EUA); Showa Denko America (New York, EUA); Phenomenex (Torrance, EUA); Waters Corporation (Milford, EUA); e Agilent Technologies (Santa Clara, EUA). A coluna analítica utilizada na etapa final de desenvolvimento e posteriores validações, no modo de eluição por interação hidrofílica: Kinetex® HILIC fused-core, dimensões: 150 x 4,6 mm; 2,6 µm de tamanho de partícula e 100 Å de tamanho de poro, foi adquirida da Phenomenex (Torrance, EUA).

Para a pesagem dos reagentes, padrões e amostras foi utilizada uma balança analítica modelo XS205DU DualRange com precisão de 0,01 mg e uma balança microanalítica modelo MX5 com precisão de 0,001 mg, ambas de marca Mettler Toledo® (Langacher, Suíça).

As micropipetas utilizadas no preparo das soluções da validação foram de marca HandyStep®.

As vidrarias volumétricas utilizadas em todos os preparos de soluções são classe A e aferidas segundo as normas RBC-Inmetro de pela empresa TecLabor (São Paulo, Brasil).

Os métodos analíticos foram validados nos seguintes sistemas cromatográficos:

**Sistema 1:** Sistema de Cromatografia líquida de alta eficiência da marca Waters modelo Alliance composto de um módulo integrado modelo 2695 contendo bomba quaternária, degaseificador, auto-injetor, compartimento termostatizado de amostras e compartimento termostatizado de coluna; detector espectrofotométrico de absorção no UV visível, de comprimento de onda variável, modelo 2489. Os cromatogramas foram registrados pelo software Empower 2 Network.

**Sistema 2:** Cromatógrafo analítico líquido de alta eficiência da marca Waters modelo Alliance composto de um módulo integrado modelo 2695 contendo bomba quaternária, degaseificador, auto-injetor, compartimento termostatizado de amostras e compartimento termostatizado de coluna; detector espectrofotométrico de absorção no UV visível com arranjo de fotodiodos modelo 2998. Os cromatogramas foram registrados pelo software Empower 2 Network.

**Sistema 3:** Cromatógrafo analítico líquido de alta eficiência da marca Agilent modelo 1100 composto de bomba quaternária modelo G1311A, degaseificador modelo G1322A, auto-injetor e compartimento termostatizado de amostras modelo G1329A, compartimento termostatizado de coluna modelo G1316A; detector espectrofotométrico de absorção no UV visível, de comprimento de onda variável, modelo G1314B. Os cromatogramas foram registrados pelo software Empower 2 Network.

**Sistema 4:** Cromatógrafo analítico líquido de ultra eficiência da marca Waters modelo Acquity UPLC HClass composto de bomba quaternária modelo QSM contendo degaseificador integrado, auto-injetor e compartimento termostatizado de amostras modelo SM-FTN, compartimento termostatizado de coluna modelo CMP;

detector espectrofotométrico de absorção no UV visível com arranjo de fotodiodos modelo UPL. Os cromatogramas foram registrados pelo software Empower 2 Network.

O método analítico desenvolvido para a quantificação de impurezas conhecidas C, D e E em iodixanol foi validado nos sistemas cromatográficos 1 a 3. O sistema 1 foi utilizado nas figuras de mérito adequabilidade de sistema, linearidade, precisão inter e intradia, exatidão, limites de quantificação e de detecção, estudos de robustez, e estudos de estabilidade de soluções preparadas. O sistema 2 foi utilizado para a figura de mérito seletividade. O sistema 3 foi utilizado na figura de mérito estudos de robustez.

O método analítico desenvolvido para a quantificação de teor em iodixanol foi validado no sistema cromatográfico 4. O sistema 4 foi utilizado nas figuras de mérito adequabilidade de sistema, seletividade, linearidade, precisão inter e intradia, exatidão, seletividade, limites de detecção e quantificação, estudos de robustez, e estudos de estabilidade de soluções preparadas.

## **3.2. Preparo das amostras para a análise de impurezas conhecidas**

Após determinar as condições cromatográficas para separação das impurezas conhecidas, o método cromatográfico foi validado e determinaram-se os parâmetros de linearidade, precisão, inter e intradia, exatidão, limites de quantificação e detecção, estudos de robustez, e estudos de estabilidade. Os conteúdos de impurezas conhecidas foram mensurados, utilizando a equação de regressão linear obtida por meio de curva analítica.

### **3.2.1. Preparo das soluções utilizadas na validação de impurezas**

**Solução de ácido fórmico 1 mmol·L<sup>-1</sup> pH 3,2:** foram transferidos cerca de 150 mL de água ultrapura para um béquer de 250 mL e adicionou-se 1,7 mL de ácido fórmico 88%. Foi homogeneizado e ajustado o pH desta solução com hidróxido de amônio para pH 3,20 ± 0,05. Esta solução foi transferida para um balão volumétrico de 200 mL e o volume completado com água ultrapura. Foram

transferidos 5.0 mL desta solução para um balão volumétrico de 1000 mL, e completado o volume com água ultrapura. Foi ajustado o pH desta solução com ácido fórmico diluído para  $\text{pH } 3,20 \pm 0,05$  e homogeneizado.

**Fase Móvel:** foi preparada uma mistura de solução de ácido fórmico  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 3,2 e acetonitrila na proporção de 08:92, v/v, respectivamente. Foi homogeneizada e filtrada em membrana  $0,45 \mu\text{m}$ , e desgaseificada.

**Diluyente:** foi preparada uma mistura de água ultrapura: acetonitrila na proporção de 2:8, v/v, respectivamente, e homogeneizada.

**Solução estoque de impurezas para adequabilidade (Solução S<sub>1</sub>):** foram pesados em balança microanalítica 4,959 mg de impureza C, 2,495 mg de impureza D, 3,763 mg de impureza E em um balão volumétrico de 50 mL. Foi dissolvido e completado o volume com água. Concentrações:  $99,2 \mu\text{g/mL}$  de impureza C,  $49,9 \mu\text{g/mL}$  de impureza D,  $75,3 \mu\text{g/mL}$  de impureza E.

**Solução estoque de iodixanol para adequabilidade (Solução S<sub>2</sub>):** foi pesado em balança microanalítica 2,446 mg de iodixanol para um balão volumétrico de 5 mL. Foi dissolvido e completado o volume com água. Concentração:  $489 \mu\text{g/mL}$  de iodixanol.

**Solução para adequabilidade final:** foram transferidos 5,0 mL da solução S<sub>1</sub>, 1,0 mL da solução S<sub>2</sub>, e 24 mL de acetonitrila para um balão volumétrico de 100 mL, o volume do balão completado com diluyente, e homogeneizado. Concentrações:  $4,96 \mu\text{g/mL}$  de impureza C,  $2,50 \mu\text{g/mL}$  de impureza D,  $3,76 \mu\text{g/mL}$  de impureza E, e  $4,89 \mu\text{g/mL}$  de iodixanol.

**Solução de trabalho de impurezas (Solução S<sub>3</sub>):** foram transferidos 10,0 mL da solução S<sub>1</sub> para um balão volumétrico de 50 mL, adicionados 40 mL de acetonitrila, o volume do balão completado com diluyente, e homogeneizado. Concentrações:  $19,8 \mu\text{g/mL}$  de impureza C,  $9,98 \mu\text{g/mL}$  de impureza D e  $15,1 \mu\text{g/mL}$  de impureza E.

**Solução de trabalho de impureza C (Solução S<sub>4</sub>):** foi pesado em balança microanalítica 4,785 mg de impureza C para um balão volumétrico de 50 mL. Foi dissolvido e completado o volume com água. Concentração:  $95,7 \mu\text{g/mL}$  de impureza C.

**Solução de trabalho de impureza D (Solução S<sub>5</sub>):** foi pesado em balança microanalítica 3,028 mg de impureza D para um balão volumétrico de 100 mL. Foi dissolvido e completado o volume com água. Concentração: 30,3 µg/mL de impureza D.

**Solução de trabalho de impureza E (Solução S<sub>6</sub>):** foi pesado em balança microanalítica 2,653 mg de impureza E para um balão volumétrico de 50 mL. Foi dissolvido e completado o volume com água. Concentração: 53,1 µg/mL de impureza E.

**Solução de trabalho diluída de impurezas (Solução S<sub>7</sub>):** foram transferidos 5,0 mL da solução S<sub>4</sub>, 2,0 mL da solução S<sub>5</sub>, 2,5 mL da solução S<sub>6</sub>, e 38 mL de acetonitrila para um balão volumétrico de 100 mL, o volume do balão completado com diluente, e homogeneizado. Concentrações: 4,79 µg/mL de impureza C, 0,606 µg/mL de impureza D e 1,33 µg/mL de impureza E.

A partir das soluções de trabalho de impurezas (solução S<sub>3</sub>) e de trabalho diluída de impurezas (solução S<sub>7</sub>), foram preparadas, em triplicatas, as soluções da curva analítica (1 a 8), as de controle de qualidade (baixa, média e alta) e a de trabalho para limite de detecção, utilizando diluições adequadas das mesmas, nas respectivas concentrações:

**Solução curva analítica 1 (utilizada também para o limite de quantificação):** 0,479 µg/mL de impureza C, 0,0606 µg/mL de impureza D, e 0,133 µg/mL de impureza E.

**Solução curva analítica 2:** 0,992 µg/mL de impureza C, 0,499 µg/mL de impureza D, e 0,753 µg/mL de impureza E.

**Solução curva analítica 3:** 1,98 µg/mL de impureza C, 0,998 µg/mL de impureza D, e 1,51 µg/mL de impureza E.

**Solução curva analítica 4:** 2,48 µg/mL de impureza C, 1,25 µg/mL de impureza D, e 1,88 µg/mL de impureza E.

**Solução curva analítica 5:** 3,47 µg/mL de impureza C, 1,75 µg/mL de impureza D; e 2,63 µg/mL de impureza E.

**Solução curva analítica 6:** 3,97 µg/mL de impureza C, 2,00 µg/mL de impureza D, e 3,01 µg/mL de impureza E.

**Solução curva analítica 7:** 4,96 µg/mL de impureza C, 2,50 µg/mL de impureza D, e 3,76 µg/mL de impureza E.

**Solução curva analítica 8:** 5,95 µg/mL de impureza C, 2,99 µg/mL de impureza D, e 4,52 µg/mL de impureza E.

**Solução controle de qualidade baixa (CQB):** 0,574 µg/mL de impureza C, 0,0727 µg/mL de impureza D, 0,159 µg/mL de impureza E.

**Solução controle de qualidade média (CQM):** 2,98 µg/mL de impureza C, 1,50 µg/mL de impureza D e 2,26 µg/mL de impureza E.

**Solução controle de qualidade alta (CQA):** 4,46 µg/mL de impureza C, 2,25 µg/mL de impureza D e 3,39 µg/mL de impureza E.

**Solução de trabalho para limite de detecção:** 0,191 µg/mL de impureza C, 0,0242 µg/mL de impureza D, e 0,0531 µg/mL de impureza E.

**Solução teste para seletividade:** foi pesado em balança microanalítica 1,236 mg de iodixanol para um balão volumétrico de 1 mL. Foi adicionado 200 µL de água, e dissolvido. Foi completado o volume com acetonitrila, e homogeneizado. Concentração: 1,24 mg/mL de iodixanol.

**Solução estoque de impureza C para seletividade (Solução S<sub>8</sub>):** foi pesado em balança microanalítica 4,754 mg de impureza C para um balão volumétrico de 50 mL. Foi dissolvido e completado o volume com água, e homogeneizado. Concentração: 95,1 µg/mL de impureza C.

**Solução estoque de impureza D para seletividade (Solução S<sub>9</sub>):** foi pesado em balança microanalítica 2,429 mg de impureza D para um balão volumétrico de 50 mL. Foi dissolvido e completado o volume com água, e homogeneizado. Concentração: 48,6 µg/mL de impureza D.

**Solução estoque de impureza E para seletividade (Solução S<sub>10</sub>):** foi pesado em balança microanalítica 3,585 mg de impureza E para um balão volumétrico de 50 mL. Foi dissolvido e completado o volume com água, e homogeneizado. Concentração: 71,7 µg/mL de impureza E.

**Solução estoque de iodixanol para seletividade (Solução S<sub>11</sub>):** foi pesado em balança microanalítica 2,389 mg de iodixanol para um balão volumétrico de 5 mL. Foi dissolvido e completado o volume com água, e homogeneizado. Foi transferido 1,0 mL desta solução a um balão volumétrico de 5 mL, completado o volume com água, e homogeneizado. Concentração final: 95,6 µg/mL de iodixanol.

A partir das soluções estoque de impureza C para seletividade (Solução S<sub>8</sub>), estoque de impureza D para seletividade (Solução S<sub>9</sub>), estoque de impureza E para seletividade (Solução S<sub>10</sub>) e estoque de iodixanol para seletividade (Solução S<sub>11</sub>), foram preparadas as soluções de trabalho para seletividade, utilizando diluições adequadas das mesmas, nas respectivas concentrações:

**Solução de trabalho de impureza C para seletividade:** 4,75 µg/mL de impureza C.

**Solução de trabalho de impureza D para seletividade:** 2,43 µg/mL de impureza D.

**Solução de trabalho de impureza E para seletividade:** 3,59 µg/mL de impureza E

**Solução de trabalho de iodixanol para seletividade:** 4,78 µg/mL de iodixanol.

**Solução de trabalho de iodixanol com impurezas para seletividade:** foi pesado em balança microanalítica 1,186 mg de iodixanol para um balão volumétrico de 1 mL. Foram transferidos 50 µL da Solução S<sub>8</sub>, 50 µL da Solução S<sub>9</sub>, 50 µL da Solução S<sub>10</sub> e 50 µL de água. Foi dissolvido, completado o volume com acetonitrila, e homogeneizado. Concentrações: 4,75 µg/mL de impureza C, 2,43 µg/mL de impureza D, 3,59 µg/mL de impureza E, e 1,19 mg/mL de iodixanol.

**Solução estoque de impurezas para robustez (Solução S<sub>12</sub>):** foram pesados em balança microanalítica 4,893 mg de impureza C, 2,414 mg de impureza D, 3,752 mg de impureza E em um balão volumétrico de 50 mL. Foram dissolvidos em água e o volume completado com o mesmo solvente. Concentrações: 97,9 µg/mL de impureza C, 48,3 µg/mL de impureza D, 75,0 µg/mL de impureza E.

**Solução estoque de iodixanol para robustez (Solução S<sub>13</sub>):** foi pesado em balança microanalítica 2,434 mg de iodixanol para um balão volumétrico de 5 mL. Foi dissolvido e completado o volume com água. Concentração: 487 µg/mL de iodixanol.

**Solução de trabalho para robustez:** foram transferidos 5,0 mL da solução S<sub>12</sub>, 1,0 mL da solução S<sub>13</sub>, e 24 mL de acetonitrila para um balão volumétrico de 100 mL, o volume do balão completado com diluente, e homogeneizado. Concentrações: 4,89 µg/mL de impureza C, 2,41 µg/mL de impureza D, 3,75 µg/mL de impureza E, e 4,87 µg/mL de iodixanol.

### **3.2.2.Preparo das soluções utilizadas na aplicação do método de impurezas**

Os preparos de solução de ácido fórmico 1 mmol·L<sup>-1</sup> pH 3,2, fase móvel e diluente foram conduzidos conforme descritos anteriormente no item 3.2.1 (p. 28 e 29).

**Solução estoque de impurezas para adequabilidade (Solução S<sub>14</sub>):** foram pesados em balança microanalítica 5,034 mg de impureza C, 2,473 mg de impureza D, 3,741 mg de impureza E em um balão volumétrico de 50 mL. Foram dissolvidos em água e o volume completado com o mesmo solvente. Concentrações: 100,7 µg/mL de impureza C, 49,5 µg/mL de impureza D, 74,8 µg/mL de impureza E.

**Solução estoque de iodixanol para adequabilidade (Solução S<sub>15</sub>):** foi pesado em balança microanalítica 2,448 mg de iodixanol para um balão volumétrico de 5 mL. Foi dissolvido e completado o volume com água. Concentração: 490 µg/mL de iodixanol.

**Solução para adequabilidade final:** foram transferidos 5,0 mL da solução S<sub>14</sub>, 1,0 mL da solução S<sub>15</sub>, e 24 mL de acetonitrila para um balão volumétrico de 100 mL, o volume do balão completado com diluente, e homogeneizado. Concentrações: 5,03 µg/mL de impureza C, 2,47 µg/mL de impureza D, 3,74 µg/mL de impureza E, e 4,90 µg/mL de iodixanol.



**Solução de trabalho de impurezas (Solução S<sub>16</sub>):** foram transferidos 10,0 mL da solução S<sub>14</sub> e 40 mL de acetonitrila para um balão volumétrico de 50 mL, o volume do balão completado com diluente, e homogeneizado. Concentrações: 20,1 µg/mL de impureza C, 9,89 µg/mL de impureza D e 15,0 µg/mL de impureza E.

**Solução de trabalho de impureza C (Solução S<sub>17</sub>):** foi pesado em balança microanalítica 4,836 mg de impureza C para um balão volumétrico de 50 mL. Foi dissolvido em água e o volume completado com o mesmo solvente. Concentração: 96,7 µg/mL de impureza C.

**Solução de trabalho de impureza D (Solução S<sub>18</sub>):** foi pesado em balança microanalítica 3,030 mg de impureza D para um balão volumétrico de 100 mL. Foi dissolvido em água e o volume completado com o mesmo solvente. Concentração: 30,3 µg/mL de impureza D.

**Solução de trabalho de impureza E (Solução S<sub>19</sub>):** foi pesado em balança microanalítica 2,680 mg de impureza E para um balão volumétrico de 50 mL. Foi dissolvido em água o volume completado com o mesmo solvente. Concentração: 53,6 µg/mL de impureza E.

**Solução de trabalho diluída de impurezas (Solução S<sub>20</sub>):** foram transferidos 5,0 mL da solução S<sub>17</sub>, 2,0 mL da solução S<sub>18</sub>, 2,5 mL da solução S<sub>19</sub>, e 38 mL de acetonitrila para um balão volumétrico de 100 mL, o volume do balão completado com diluente, e homogeneizado. Concentrações: 4,84 µg/mL de impureza C, 0,606 µg/mL de impureza D e 1,34 µg/mL de impureza E.

A partir das soluções de trabalho de impurezas (solução S<sub>16</sub>) e de trabalho diluída de impurezas (solução S<sub>20</sub>), foram preparadas, em triplicatas, as soluções de controle de qualidade (baixa, média e alta), utilizando-se diluições adequadas das mesmas, nas respectivas concentrações:

**Solução controle de qualidade baixa (CQB):** 0,580 µg/mL de impureza C, 0,0727 µg/mL de impureza D, 0,161 µg/mL de impureza E.

**Solução controle de qualidade média (CQM):** 3,02 µg/mL de impureza C, 1,48 µg/mL de impureza D e 2,24 µg/mL de impureza E.

**Solução controle de qualidade alta (CQA):** 4,53 µg/mL de impureza C, 2,23 µg/mL de impureza D e 3,37 µg/mL de impureza E.

As amostras de iodixanol foram pesadas em balança microanalítica, com a massa nominal de 6 mg, em balões volumétricos de 5 mL, em duplicata. Foram dissolvidas em diluente e os volumes completados com o mesmo solvente. Concentrações nominais: 1,20 mg/mL de iodixanol. As massas e as concentrações utilizadas em três diferentes lotes de amostras de matéria prima de iodixanol dessas amostras são apresentadas na TABELA 3.1.

TABELA 3.1: Massas e concentrações utilizadas na aplicação do método de impurezas em três diferentes lotes de amostras de matéria prima iodixanol.

Amostra	Replicata #	Massa (mg)	Concentração (mg/mL)
Lote #1	1	5,952	1,19
	2	6,018	1,20
Lote #2	1	6,007	1,20
	2	6,017	1,20
Lote #3	1	6,002	1,20
	2	6,006	1,20

### 3.3. Preparo das amostras para a análise de teor

De forma análoga à validação do método analítico de impurezas, após determinar as condições cromatográficas para o teor, o método cromatográfico foi validado e determinaram-se os parâmetros de linearidade, precisão, inter e intradia, exatidão, limites de quantificação e detecção, estudos de robustez, e estudos de estabilidade. Os conteúdos de impurezas conhecidas foram mensurados, utilizando a equação de regressão linear obtida por meio de curva analítica.

### 3.3.1. Preparo das soluções utilizadas na validação de teor

Os preparos de solução de ácido fórmico  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 3,2, fase móvel e diluente foram conduzidos conforme descritos anteriormente no item 3.2.1 (p. 28 e 29).

**Solução estoque de iodixanol para adequabilidade e curva analítica (Solução S<sub>21</sub>):** foi pesado em balança microanalítica 16,018 mg de iodixanol para um balão volumétrico de 20 mL. Foi dissolvido em diluente e o volume completado com o mesmo solvente. Concentração: 0,801 mg/mL de iodixanol.

**Solução para adequabilidade (Solução S<sub>22</sub>):** foram transferidos 2,5 mL da solução S<sub>21</sub>, para um balão volumétrico de 10 mL, o volume do balão completado com diluente, e homogeneizado. Concentração: 0,200 mg/mL de iodixanol.

**Solução de trabalho de iodixanol para seletividade:** utilizou-se a solução S<sub>22</sub>, conforme descrito acima.

A partir da solução estoque de iodixanol para adequabilidade e curva analítica (Solução S<sub>21</sub>), foram preparadas, em triplicatas, as soluções da curva analítica (1 a 5), utilizando diluições adequadas das mesmas, nas respectivas concentrações:

**Solução curva analítica 1:** 0,160 mg/mL de iodixanol.

**Solução curva analítica 2:** 0,180 mg/mL de iodixanol.

**Solução curva analítica 3:** 0,200 mg/mL de iodixanol.

**Solução curva analítica 4:** 0,220 mg/mL de iodixanol.

**Solução curva analítica 5:** 0,240 mg/mL de iodixanol.

**Solução estoque de iodixanol para controle de qualidade (Solução S<sub>23</sub>):** foi pesado em balança microanalítica 16,287 mg de iodixanol para um balão volumétrico de 20 mL. Foi dissolvido em diluente e o volume completado com o mesmo solvente. Concentração: 0,814 mg/mL de iodixanol.

A partir da solução estoque de iodixanol para controle de qualidade (Solução S<sub>23</sub>), foram preparadas, em triplicatas, as soluções de controle de qualidade (baixa, média e alta), de trabalho para o limite de quantificação, de trabalho para o limite de detecção, e uma replicata da de trabalho para robustez, utilizando diluições adequadas das mesmas, nas respectivas concentrações:

**Solução controle de qualidade baixa (CQB):** 0,175 mg/mL de iodixanol.

**Solução controle de qualidade média (CQM):** 0,216 mg/mL de iodixanol.

**Solução controle de qualidade alta (CQA):** 0,236 mg/mL de iodixanol.

**Solução de trabalho para limite de quantificação 1:** 1,00 µg/mL de iodixanol.

**Solução de trabalho para limite de quantificação 2:** 0,701 µg/mL de iodixanol.

**Solução de trabalho para limite de detecção:** 0,300 µg/mL de iodixanol.

**Solução de trabalho para robustez:** 0,204 mg/mL de iodixanol.

### **3.3.2. Preparo das soluções utilizadas na aplicação do método de teor**

Os preparos de solução de ácido fórmico 1 mmol·L<sup>-1</sup> pH 3,2, fase móvel e diluente foram conduzidos conforme descritos anteriormente no item 3.2.1 (p. 28 e 29).

**Solução estoque de iodixanol para adequabilidade (Solução S<sub>24</sub>):** foi pesado em balança microanalítica 16,012 mg de iodixanol para um balão volumétrico de 20 mL. Foi dissolvido em diluente e o volume completado com o mesmo solvente. Concentração: 0,801 mg/mL de iodixanol.

**Solução para adequabilidade:** foram transferidos 2,5 mL da solução S<sub>24</sub> para um balão volumétrico de 10 mL, o volume do balão completado com diluente, e homogeneizado. Concentração: 0,200 mg/mL de iodixanol.

A partir da solução estoque de iodixanol para adequabilidade (Solução S<sub>24</sub>), foram preparadas, em triplicatas, as soluções de controle de qualidade (baixa, média e alta), utilizando diluições adequadas das mesmas, nas respectivas concentrações:

**Solução controle de qualidade baixa (CQB):** 0,172 mg/mL de iodixanol.

**Solução controle de qualidade média (CQM):** 0,212 mg/mL de iodixanol.

**Solução controle de qualidade alta (CQA):** 0,232 mg/mL de iodixanol.

As amostras de iodixanol foram pesadas em balança microanalítica, com a massa nominal de 2 mg, em balões volumétrico de 10 mL, em duplicata. Foram dissolvidas em diluente e os volumes completados com o mesmo solvente. Concentrações nominais: 0,200 mg/mL de iodixanol. As massas e as concentrações utilizadas em três diferentes lotes de amostras de matéria prima de iodixanol dessas amostras são apresentadas na TABELA 3.2.

TABELA 3.2: Massas e concentrações utilizadas na aplicação do método de teor em três diferentes lotes de amostras de matéria prima iodixanol.

Amostra	Replicata #	Massa (mg)	Concentração (mg/mL)
Lote #1	1	1,962	0,196
	2	2,001	0,200
Lote #2	1	2,030	0,203
	2	1,976	0,198
Lote #3	1	2,206	0,221
	2	2,092	0,209

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. Desenvolvimento do método

Seguindo os conceitos de ortogonalidade, e tendo como finalidade principal atingir a seletividade, as primeiras etapas do desenvolvimento analítico foram efetuadas através da triagem de uma série de colunas, devidamente selecionadas de acordo com o critério de comparação de seletividade de colunas descritas por MARCHAND et. al.,<sup>19</sup> onde os parâmetros no modo reverso de eluição são determinados por cinco características previamente discutidos (p. 14).

Dessa forma, efetuaram-se mudanças efetivas nos métodos avaliados “ortogonalmente”, utilizando-se colunas de seletividades distintas ( $F_s \geq 10$ ), no modo reverso de eluição.

Durante as primeiras etapas do desenvolvimento analítico, o modo reverso foi inicialmente avaliado, baseado em trabalhos de SNYDER et. al.<sup>17; 45</sup> Os modificadores orgânicos foram selecionados de acordo com as propriedades dos solventes: acidez, basicidade e polaridade. O uso do triângulo de solventes implica que apenas três solventes são necessários para que se consiga a seletividade desejada. Foram, portanto, avaliadas as interações analito-fase estacionária e diferentes modificadores orgânicos, sendo acetonitrila (ACN), metanol e tetraidrofurano (THF), e empregada a otimização sistemática da separação.<sup>46</sup>

Os estudos foram então intensificados pela avaliação de diferentes faixas de pH, influência de temperatura da coluna e eluição gradiente, bem como a otimização da fase estacionária – colunas do tipo *fused core* – de alta eficiência cromatográfica – foram avaliadas.

Entretanto, no modo reverso de eluição, os resultados obtidos de fatores de retenção foram próximos, tanto para as impurezas conhecidas como para o iodixanol. Desse modo, as substâncias analisadas apresentaram interações similares, mesmo em diversas condições testadas no modo reverso; comprometendo assim o objetivo principal do método: a seletividade.

Analisando-se as propriedades físico-químicas das moléculas de iodixanol e de suas impurezas conhecidas, pode-se concluir que as substâncias apresentam alta polaridade. As impurezas conhecidas de iodixanol estudadas neste projeto, bem como o próprio iodixanol, apresentaram os seguintes valores calculados de log P, de acordo com a TABELA 4.1: <sup>47; 48</sup>

TABELA 4.1: Valores calculados de log P para o iodixanol e suas impurezas conhecidas

Substância	log P
Deacetil iodixanol (composto relacionado C)	-5,32
Iopentol (composto relacionado D)	-3,14
Iodixanol ciclizado (composto relacionado E)	-4,86
Iodixanol	-5,88

Dessa forma, concluiu-se que as substâncias em estudo são altamente compatíveis com o modo de eluição por interação hidrofílica (HILIC), conforme pode ser ilustrado na FIGURA 4.1. <sup>28</sup>

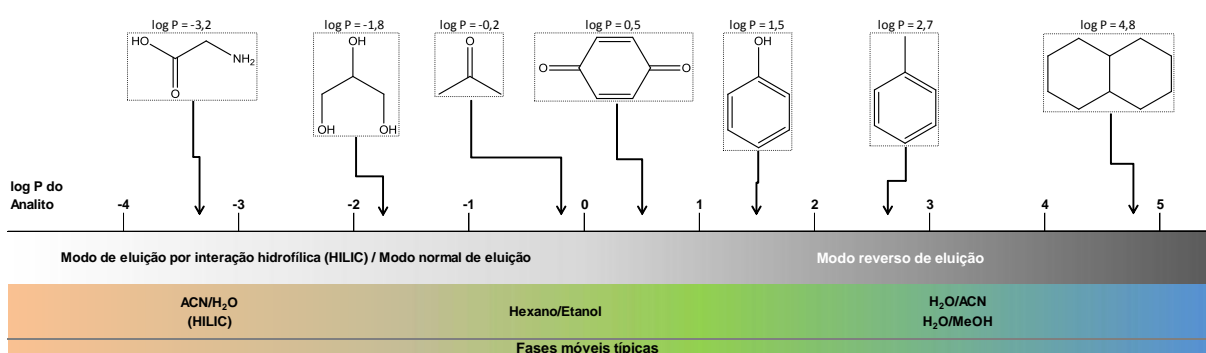


FIGURA 4.1: Representação gráfica dos diferentes modos em HPLC e suas aplicações para a separação de moléculas de diferentes polaridades, adaptado de *SIELC – HILIC*. <sup>28</sup> Quanto maior o valor de log P, mais hidrofóbico é o composto.

Com o intuito de avaliar experimentalmente se as substâncias do estudo apresentavam boa retenção no modo de eluição por interação hidrofílica (HILIC), um gradiente exploratório indicado por fabricantes de colunas foi avaliado,

empregando-se como marcador analítico o iodixanol, uma vez que os valores de log P calculados são próximos, nas condições apresentadas na TABELA 4.2.<sup>49; 50</sup>

TABELA 4.2: Condições cromatográficas exploratórias no modo HILIC<sup>(\*)</sup>.

Tempo (min)	% Fase móvel A <sup>(**)</sup>	% Fase móvel B <sup>(***)</sup>	Evento
0	100	0	Eluição isocrática inicial
2,5	100	0	Eluição isocrática inicial
2,5 → 10	100 → 0	0 → 100	Eluição gradiente
10	0	100	Eluição isocrática final
12,5	0	100	Eluição isocrática final

<sup>(\*)</sup> vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção 10  $\mu$ L, comprimento de onda 243 nm. Coluna cromatográfica: Kinetex® HILIC *fused-core*, dimensões: 150 x 4,6 mm; 2,6  $\mu$ m de tamanho de partícula e 100 Å de tamanho de poro

<sup>(\*\*)</sup> composição de fase móvel A: acetonitrila e formiato de amônio 50 mmol·L<sup>-1</sup> pH 3,2; 90:10 (v/v)

<sup>(\*\*\*)</sup> composição de fase móvel B: acetonitrila, formiato de amônio 50 mmol·L<sup>-1</sup> pH 3,2 e água; 50:10:40 (v/v)

Nas condições avaliadas desta primeira etapa de desenvolvimento, o iodixanol apresentou boa retenção no modo de eluição por interação hidrofílica (HILIC), sendo, portanto, o modo escolhido para as subseqüentes etapas do estudo.

## 4.2. Otimização do método

A condição inicialmente testada empregando-se uma fase móvel composta de acetonitrila e formiato de amônio 50 mmol·L<sup>-1</sup> pH 3,2; 90:10 (v/v) demonstrou-se adequada para as etapas iniciais do desenvolvimento do método analítico. A vazão de 1,0 mL/min foi então determinada como ponto de partida para a otimização, bem como o volume de injeção: 10  $\mu$ L, comprimento de onda: 243 nm, e coluna cromatográfica: Kinetex® HILIC *fused-core*, de dimensões: 150 x 4,6 mm; 2,6  $\mu$ m de tamanho de partícula e 100 Å de tamanho de poro.

A concentração nominal de trabalho de iodixanol foi estabelecida em 1,2 mg/mL e de suas impurezas C, D e E foram, respectivamente, 4,8  $\mu$ g/mL, 2,4  $\mu$ g/mL e 3,6  $\mu$ g/mL. Dessa forma, os estudos foram conduzidos com soluções contendo essas substâncias nestas concentrações, ou mais concentradas, de



acordo com a necessidade. Em alguns casos, injeções de soluções de iodixanol e de impureza C, consideradas as substâncias que compõem o par crítico das análises, foram avaliadas.

O diluente escolhido deve ser o mais compatível possível com a fase móvel, sem a interferência de sais ou tampões, e que apresentasse boa solvatação para estas substâncias. Determinou-se a composição de acetonitrila e água 8:2 (v/v) como sendo o diluente adequado.

## **Temperatura da coluna**

A primeira variável avaliada na otimização do método foi a temperatura da coluna cromatográfica. O estudo compreendeu temperaturas entre 10 e 30°C (FIGURA 4.2).

Concluiu-se que a melhor temperatura foi a de 20°C, pois apresentou melhores resultados em termos de resolução entre as bandas de impurezas e de iodixanol.

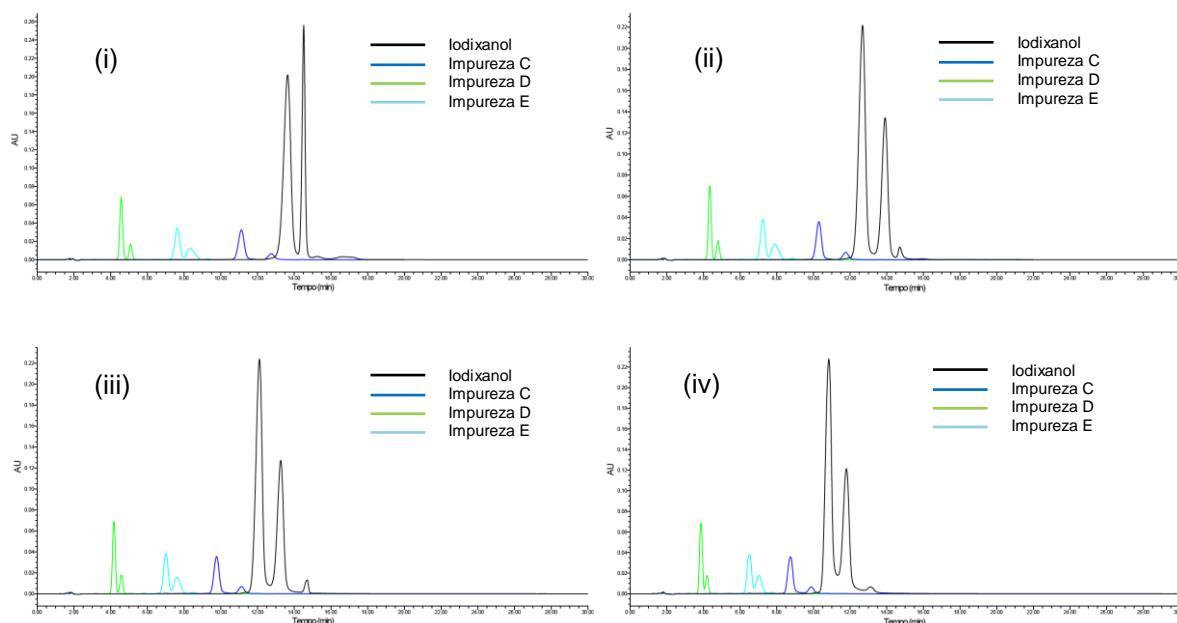


FIGURA 4.2: Cromatogramas representativos da etapa de otimização de método. Condições cromatográficas: vazão de 1,0 mL/min; composição de fase móvel: acetonitrila e formiato de amônio  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 3,2 (90:10, v/v); variações de temperatura da coluna: (i) = 10 °C; (ii) = 15 °C; (iii) = 20 °C; (iv) = 30 °C.

## Modificador orgânico

No modo HILIC, usualmente é empregado o uso de acetonitrila como modificador orgânico. Entretanto, qualquer solvente polar miscível com água pode ser empregado.

Na literatura pesquisada, é citado que o acetato de etila aumenta a retenção e melhora a seletividade de alguns compostos, bem como o THF que normalmente reduz a retenção e prejudica a seletividade. A ordem de força dos solventes em HILIC é apresentada na TABELA 4.3. <sup>33; 51; 52; 53; 54; 55; 56</sup>

TABELA 4.3: Ordem de força dos solventes em HILIC.

Solvente	Força do solvente em HILIC
Acetato de Etila	Menos forte
THF	
Acetona	
Isopropanol/n-propanol	
Acetonitrila	↓
Etanol	
Dioxano	
DMF/Metanol	
Água	Mais forte

Com a temperatura estabelecida em 20°C, empregou-se o estudo de diferentes modificadores orgânicos (FIGURA 4.3). Acetato de etila, THF e etanol foram escolhidos e avaliados nas composições de fase móvel apresentadas na TABELA 4.4. O acetato de etila não demonstrou melhorias significativas na seletividade, não justificando a sua adição. Em contrapartida, a adição de THF e etanol apresentaram desempenhos similares, tornando os compostos menos retensivos e, dessa forma, comprometendo a seletividade.

TABELA 4.4: Composições de fase móvel para estudo de modificadores orgânicos.

Componentes da fase móvel	Composição (v/v)
ACN : acetato de etila : formiato de amônio 50 mmol·L <sup>-1</sup> pH 3,2	85:05:10
	80:10:10
	70:20:10
ACN : THF : formiato de amônio 50 mmol·L <sup>-1</sup> pH 3,2	85:05:10
	80:10:10
ACN : etanol : formiato de amônio 50 mmol·L <sup>-1</sup> pH 3,2	85:05:10
	80:10:10

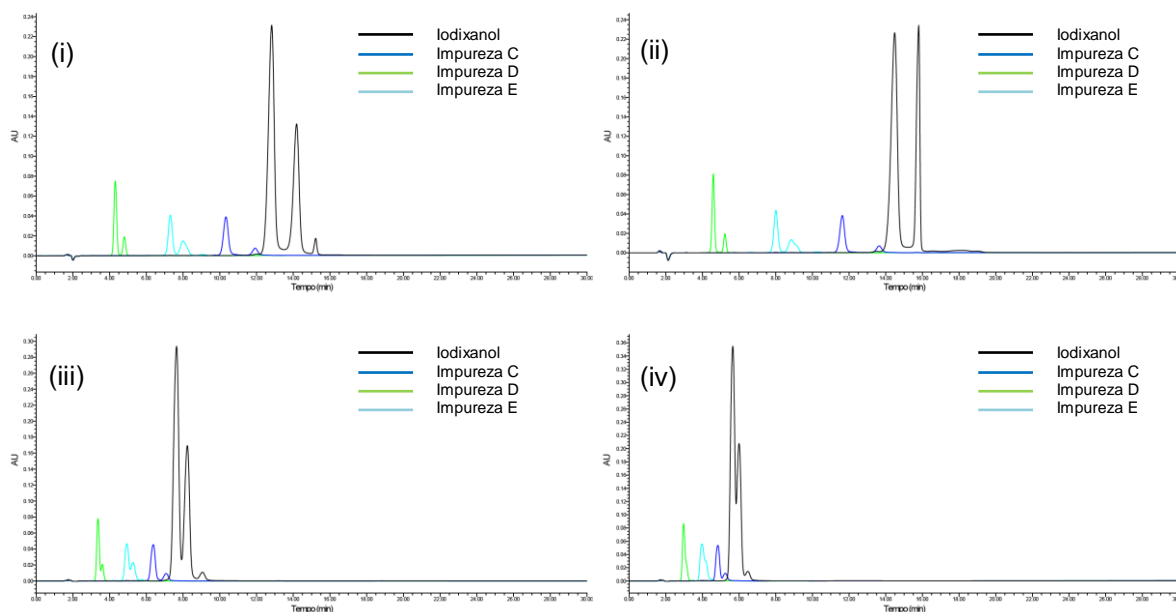


FIGURA 4.3: Cromatogramas representativos da etapa de otimização de método. Condições cromatográficas: vazão de 1,0 mL/min; temperatura da coluna: 20 °C; variações de composição de fase móvel:

(i) = acetonitrila, acetato de etila e formiato de amônio 50 mmol·L<sup>-1</sup> pH 3,2 (80:10:10, v/v);

(ii) = acetonitrila, acetato de etila e formiato de amônio 50 mmol·L<sup>-1</sup> pH 3,2 (70:20:10, v/v);

(iii) = acetonitrila, THF e formiato de amônio 50 mmol·L<sup>-1</sup> pH 3,2 (85:05:10, v/v);

(iv) = acetonitrila, etanol e formiato de amônio 50 mmol·L<sup>-1</sup> pH 3,2 (85:05:10, v/v).

## Aditivos e pH

Os estudos de aditivos e pH ocorreram de forma concomitante uma vez que os aditivos estudados alteravam significativamente o pH da fase móvel. Apesar dos compostos analisados não apresentarem características ionizáveis, no modo HILIC utilizando-se colunas de sílica, a fase estacionária é suscetível a alterações de comportamento em função do pH, devido às fortes interações eletrostáticas evidenciadas neste tipo de coluna. <sup>55</sup>

As composições de fase móvel estão listadas na TABELA 4.5, bem como as observações pertinentes ao estudo. Os cromatogramas são apresentados na FIGURA 4.4.

TABELA 4.5: Composições de fase móvel para estudo de pH e aditivos.

Composição de fase móvel	Observações
ACN : acetato de amônio 50 mmol·L <sup>-1</sup> pH 5,7; 90:10 (v/v)	Co-eluições / perda de seletividade
ACN : formiato de amônio 50 mmol·L <sup>-1</sup> pH 4,5; 90:10 (v/v)	Co-eluições / perda de seletividade
ACN : TFA 0,1% pH 2,0; 90:10 (v/v)	Sem alterações significativas na seletividade. Diminuição do tempo de retenção. Diminuição da vida útil da coluna.
ACN : trietilamina 50 mmol·L <sup>-1</sup> pH 3,2 ajuste com ácido fórmico; 90:10 (v/v)	Sem alterações significativas na seletividade. Diminuição do tempo de retenção.

Dessa forma, concluiu-se que o estudo de pH entre 4,5 e 5,7 interferiram negativamente na seletividade e que o uso de aditivos não se faz necessário. Durante este estudo foi observado, também, que a adição de TFA na fase móvel acarretou na diminuição da vida útil da coluna analítica, visualizado através da perda de eficiência das bandas de iodixanol, através de injeções consecutivas. Dessa forma, as etapas subsequentes foram conduzidas com uma nova coluna analítica idêntica à utilizada nestes estudos.

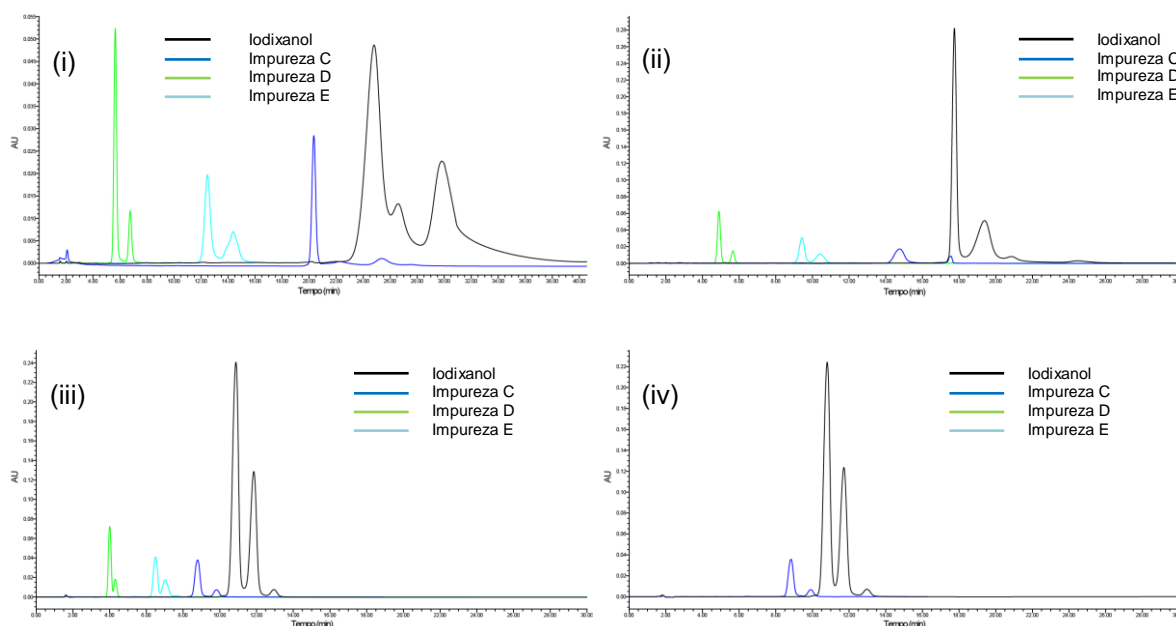


FIGURA 4.4: Cromatogramas representativos da etapa de otimização de método. Condições cromatográficas: vazão de 1,0 mL/min; temperatura da coluna: 20 °C; variações de composição de fase móvel:

(i) = acetonitrila e acetato de amônio 50 mmol·L<sup>-1</sup> pH 5,7 (90:10, v/v);

(ii) = acetonitrila e formiato de amônio 50 mmol·L<sup>-1</sup> pH 4,5 (90:10, v/v);

(iii) = acetonitrila e TFA 0,1% pH 2,0 (90:10, v/v);

(iv) = acetonitrila e trietilamina 50 mmol·L<sup>-1</sup> ajustado com ácido fórmico para pH 3,2 (90:10, v/v)

## Força Iônica

Com o intuito de avaliar uma ampla faixa de força iônica, os estudos compreenderam o uso de tampão formiato de amônio em pH 3,2, nas concentrações de 1 mmol·L<sup>-1</sup> a 200 mmol·L<sup>-1</sup> (FIGURA 4.5). A solução tampão que se demonstrou mais adequada em termos de seletividade foi uma preparação de ácido fórmico a 1 mmol·L<sup>-1</sup> e ajustada com hidróxido de amônio para pH 3,2. A composição da fase móvel para todos os testes permaneceu a mesma (ACN: solução tampão, 90:10; v/v).

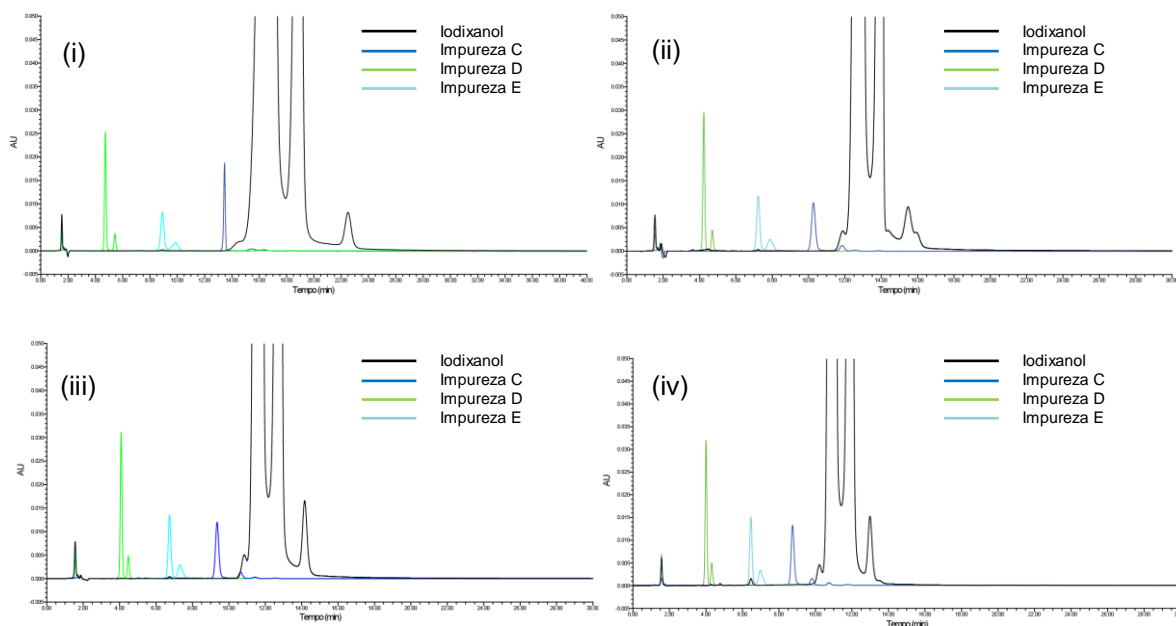


FIGURA 4.5: Cromatogramas representativos da etapa de otimização de método. Condições cromatográficas: vazão de 1,0 mL/min; temperatura da coluna: 20 °C; variações de composição de fase móvel:

(i) = acetonitrila e formiato de amônio 200 mmol·L<sup>-1</sup> pH 3,2 (90:10, v/v);

(ii) = acetonitrila e formiato de amônio 100 mmol·L<sup>-1</sup> pH 3,2 (90:10, v/v);

(iii) = acetonitrila e formiato de amônio 50 mmol·L<sup>-1</sup> pH 3,2 (90:10, v/v);

(iv) = acetonitrila e ácido fórmico 1 mmol·L<sup>-1</sup> ajustada com hidróxido de amônio para pH 3,2 (90:10, v/v).

## Proporção fase móvel

A proporção de fase móvel foi avaliada variando-se de 95:05 a 90:10 (v/v), contendo ACN e solução de ácido fórmico a 1 mmol·L<sup>-1</sup> ajustada com hidróxido de amônio para pH 3,2, respectivamente. A proporção mais adequada em termos de seletividade foi a de 92:08 (v/v). O cromatograma obtido é apresentado na FIGURA 4.6.

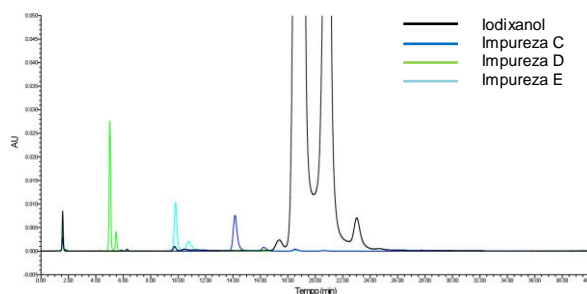


FIGURA 4.6: Cromatograma representativo da etapa de otimização de método. Condições cromatográficas: vazão de 1,0 mL/min; composição de fase móvel: acetonitrila e ácido fórmico  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  ajustada com hidróxido de amônio para pH 3,2 (92:08, v/v); temperatura da coluna:  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## Vazão

Variações na vazão entre 0,6 e 1,0 mL/min foram avaliadas. A vazão mais adequada foi a de 0,8 mL/min, por apresentar melhores resultados de seletividade e resolução entre a última banda da impureza C e a primeira banda de iodixanol. Os cromatogramas são apresentados na FIGURA 4.7.

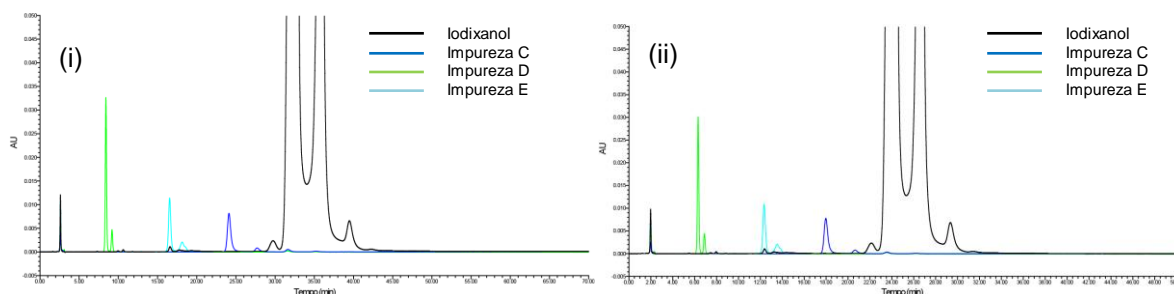


FIGURA 4.7: Cromatogramas representativos da etapa de otimização de método. Condições cromatográficas: composição de fase móvel: acetonitrila e ácido fórmico  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  ajustada com hidróxido de amônio para pH 3,2 (92:08, v/v); temperatura da coluna:  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ; variações de vazão: (i) = 0,6 mL/min; (ii) = 0,8 mL/min.



## Método final

A TABELA 4.6 apresenta as condições cromatográficas do método otimizado desenvolvido. Os tempos de retenções relativos da banda principal de cada substância são apresentados na TABELA 4.7, e o exemplo de um cromatograma representativo da separação cromatográfica de uma solução contendo as impurezas C, D e E, e o iodixanol pode ser visualizado na FIGURA 4.8.

O método desenvolvido também foi aplicado como possível substituto ao método de teor da matéria prima iodixanol preconizado na USP 36, no qual consiste de uma titulação potenciométrica.<sup>57</sup> Um exemplo de um cromatograma do método de teor pode ser visualizado na FIGURA 4.9.

Como podem ser visualizadas nos cromatogramas, duas bandas são observadas para cada composto, uma vez que cada um deles é uma mistura estereoisomérica.

TABELA 4.6: Condições cromatográficas do método desenvolvido.

Detecção:	Ultravioleta (UV)
Comprimento de onda:	243 nm
Coluna:	Phenomenex Kinetex® HILIC <i>fused-core</i> , dimensões: 150 x 4,6 mm; 2,6 µm de tamanho de partícula e 100 Å de tamanho de poro
Temperatura da coluna:	20°C
Vazão:	0,8 mL/min
Modo de eluição:	Isocrático
Volume de injeção:	10 µL
Tempo de retenção de Iodixanol:	Aproximadamente 22 minutos (banda principal)
Tempo de corrida:	45 minutos
Diluyente:	Água : Acetonitrila (20:80, v/v)
Fase móvel:	Solução de ácido fórmico 1 mmol·L <sup>-1</sup> pH 3,2: Acetonitrila (08:92, v/v)

TABELA 4.7: Tempos de Retenções Relativos:

Substância	Tempo de Retenção Relativo (TRR) (bandas principais)
Impureza C	0,8
Impureza D	0,3
Impureza E	0,5
Iodixanol	1,0

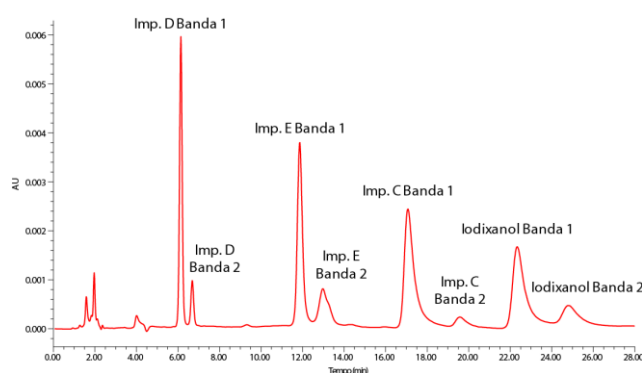


FIGURA 4.8: Cromatograma representativo de solução contendo as impurezas C, D e E e o iodixanol no método final desenvolvido para quantificação de impurezas.

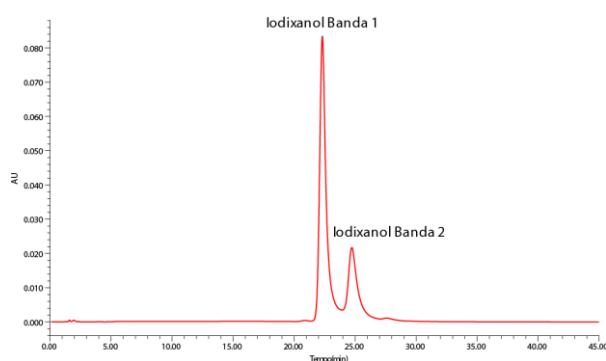


FIGURA 4.9: Cromatograma representativo de solução contendo iodixanol no método final desenvolvido para quantificação de teor.

### 4.3. Validação do método analítico

A validação do método analítico proposto compreende duas etapas distintas: a validação do método de quantificação de impurezas conhecidas C, D e E

na matéria prima iodixanol e a validação do método de quantificação de teor da matéria prima iodixanol.

Como relatado anteriormente, são observadas duas bandas principais para cada composto. Desta forma, as validações foram efetuadas com as somatórias de áreas das bandas para cada composto.

#### 4.3.1. Validação do método analítico de impurezas conhecidas

Com as condições cromatográficas estabelecidas, o método analítico desenvolvido para a quantificação de impurezas conhecidas C, D e E em iodixanol foi validado de acordo com as normas preconizadas pela USP 36, capítulo geral <1225> *VALIDATION OF COMPENDIAL PROCEDURES*, onde inclusive são citadas as normas do ICH. As figuras de mérito avaliadas foram adequabilidade de sistema, seletividade, curva analítica, precisão, inter e intradia, exatidão, limites de quantificação e detecção, estudos de robustez, e estudos de estabilidade de soluções preparadas. <sup>43; 44; 58; 59</sup>

A análise das impurezas conhecidas e a validação foram conduzidas de acordo com as condições cromatográficas descritas anteriormente na TABELA 4.6 (p. 50).

Os intervalos de concentração utilizados na construção das curvas de calibração foram estipulados de acordo com as especificações dos limites máximos permitidos para a matéria prima iodixanol, de acordo com a monografia descrita na USP 36. <sup>57</sup> Essas especificações são detalhadas na TABELA 4.8.

TABELA 4.8: Especificação dos limites máximos de cada impureza conhecida, preconizado na monografia de iodixanol da USP 36. <sup>57</sup>

Composto	Especificação
Impureza C	Máximo: 0,4%
Impureza D	Máximo: 0,2%
Impureza E	Máximo: 0,3%

## Adequabilidade de sistema

Testes de adequabilidade do sistema são partes integrantes de métodos cromatográficos e utilizados para verificar se o sistema cromatográfico está adequado para a análise pretendida. Os testes são baseados no conceito de que o equipamento, as partes eletrônicas, as operações analíticas, e as amostras a serem analisadas constituem um sistema íntegro e podem ser avaliados como tal.<sup>60</sup> A adequabilidade do sistema é requerida no início de todos os ensaios de quantificação de impurezas no iodixanol, inclusive na validação do método. A TABELA 4.9 apresenta os resultados obtidos para o teste de adequabilidade de sistema, bem como os critérios de aceitação; utilizando-se uma solução contendo as concentrações de 4,96 µg/mL de impureza C, 2,50 µg/mL de impureza D, 3,76 µg/mL de impureza E, e 4,89 µg/mL de iodixanol.

Como pode ser observado, os resultados obtidos para o teste de adequabilidade de sistema estão de acordo com os critérios de aceitação adotados.

TABELA 4.9: Parâmetros e resultados obtidos de adequabilidade de sistema.

Parâmetro	Teste	Resultado	Critério de aceitação
Fator de cauda	Impureza D (banda principal)	1,1	Entre 0,8-1,5
Razão de distribuição de massa	Fator de capacidade (k) - Impureza D (banda principal)	3,7	Não menos que 0,6
Eficiência da coluna	Componente individual (bandas principais)	Impureza C = 10525 Impureza D = 10142 Impureza E = 12132	Não menos que 2000 pratos/coluna
Precisão do sistema	6 determinações da solução padrão de referência do mesmo preparo (somatória de área das bandas)	Impureza C = 0,3% Impureza D = 0,3% Impureza E = 0,4%	CV ≤ 2,0%
Resolução	Entre a última banda do Impureza C e primeira banda do Iodixanol	3,3	Não menos que 1,5
Tempo de retenção relativo	Retenção relativa ao pico principal de Iodixanol (bandas principais)	Impureza C = 0,8 Impureza D = 0,3 Impureza E = 0,5	O tempo de retenção do pico de interesse deve ser diferente do pico de referência

## Seletividade

A seletividade do método foi avaliada comparando-se análises de diluente, fase móvel, de amostra (iodixanol), das impurezas isoladas, e de amostra fortificada com os analitos (impurezas C, D e E). Os cromatogramas obtidos não apresentaram interferentes, e apresentaram tempos de retenção distintos, para todos os analitos estudados, conforme pode ser visualizado na FIGURA 4.10. As bandas de Iodixanol e as impurezas C, D e E apresentaram espectros na região do UV-visível com pureza cromatográfica, indicando que o método é seletivo.

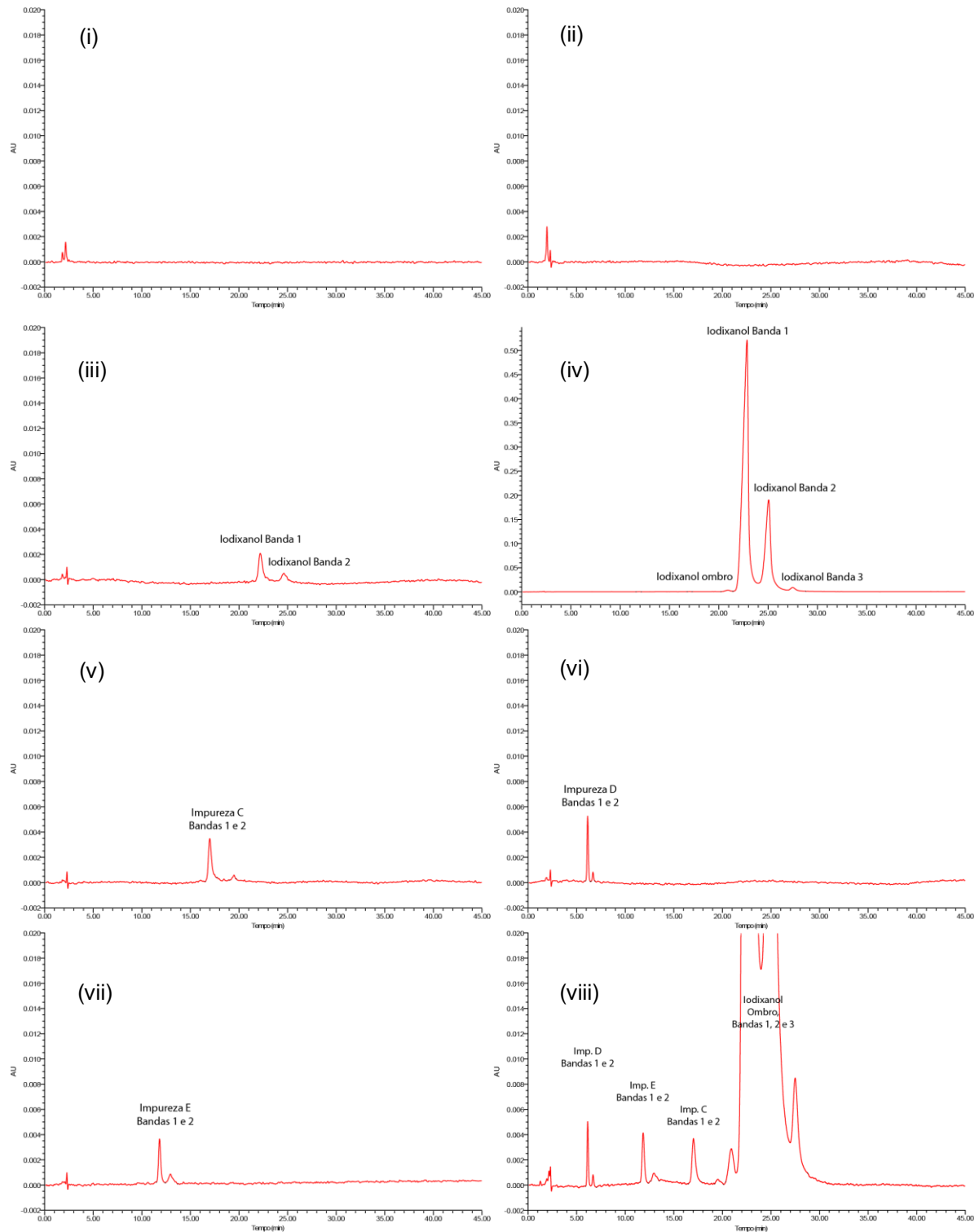


FIGURA 4.10: Cromatogramas representativos do teste de seletividade.

(i) = diluente

(ii) = fase móvel

(iii) = iodixanol (4,78 µg/mL)

(iv) = iodixanol (1,24 mg/mL)

(v) = impureza C (4,75 µg/mL)

(vi) = impureza D (2,43 µg/mL)

(vii) = impureza E (3,59 µg/mL)

(viii) = iodixanol (1,19 mg/mL),  
fortificado com: impureza C (4,75  
µg/mL); impureza D (2,43 µg/mL);  
impureza E (3,59 µg/mL)

## Linearidade

As curvas de calibração para cada impureza individual foram obtidas em função das áreas das bandas cromatográficas, relativas às seguintes concentrações: 0,479; 0,992; 1,98; 2,48; 3,47; 3,97; 4,96; 5,95 µg/mL para a impureza C; 0,0606; 0,499; 0,998; 1,25; 1,75; 2,00; 2,50; 2,99 µg/mL para a impureza D; e 0,133; 0,753; 1,51; 1,88; 2,63; 3,01; 3,76; 4,52 µg/mL para a impureza E. As soluções de calibração foram preparadas em triplicatas e 10 µL foram injetados para cada concentração.

As curvas analíticas obtidas são apresentadas nas FIGURAS 4.11 a 4.13.

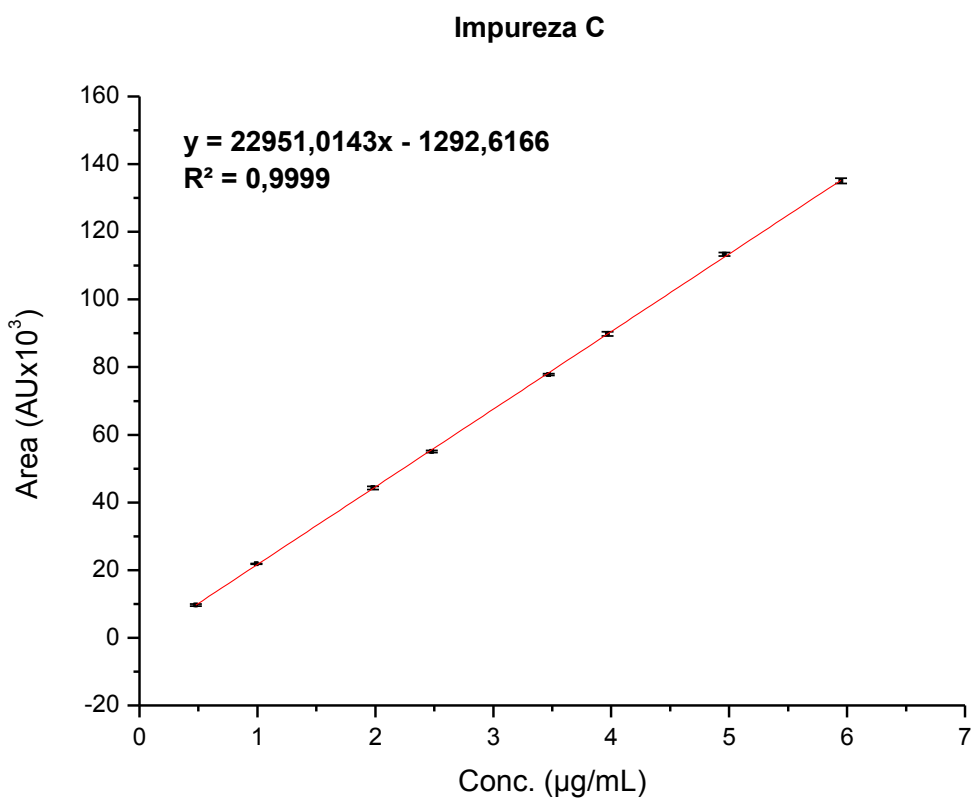


FIGURA 4.11: Curva analítica obtida da impureza C.

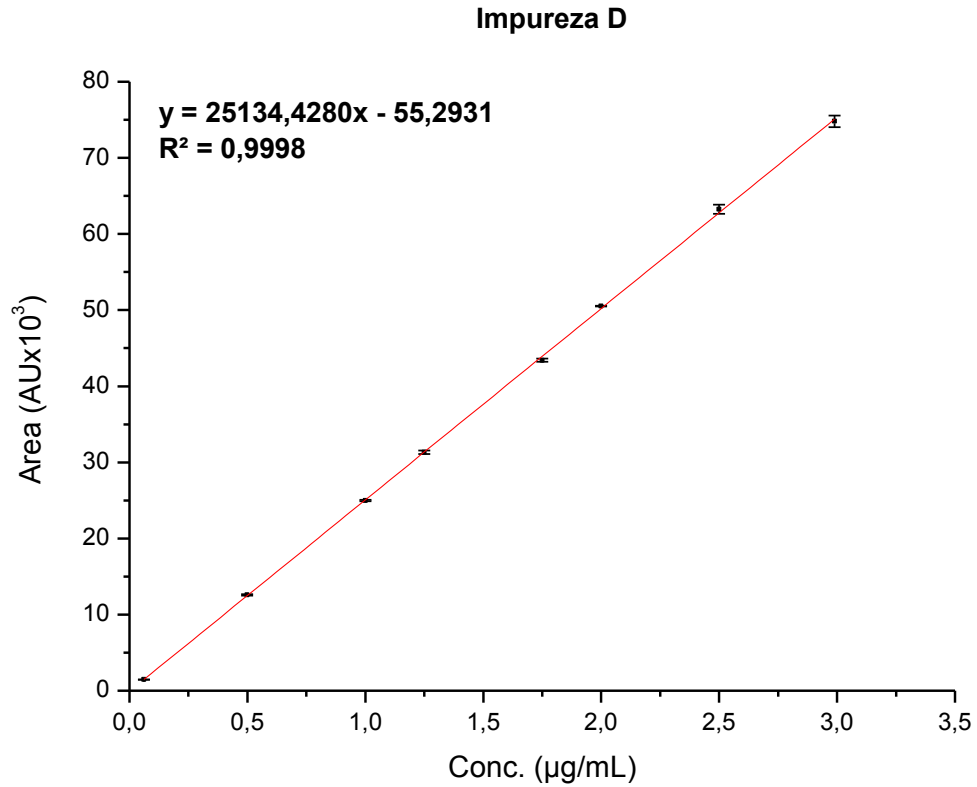


FIGURA 4.12: Curva analítica obtida da impureza D.

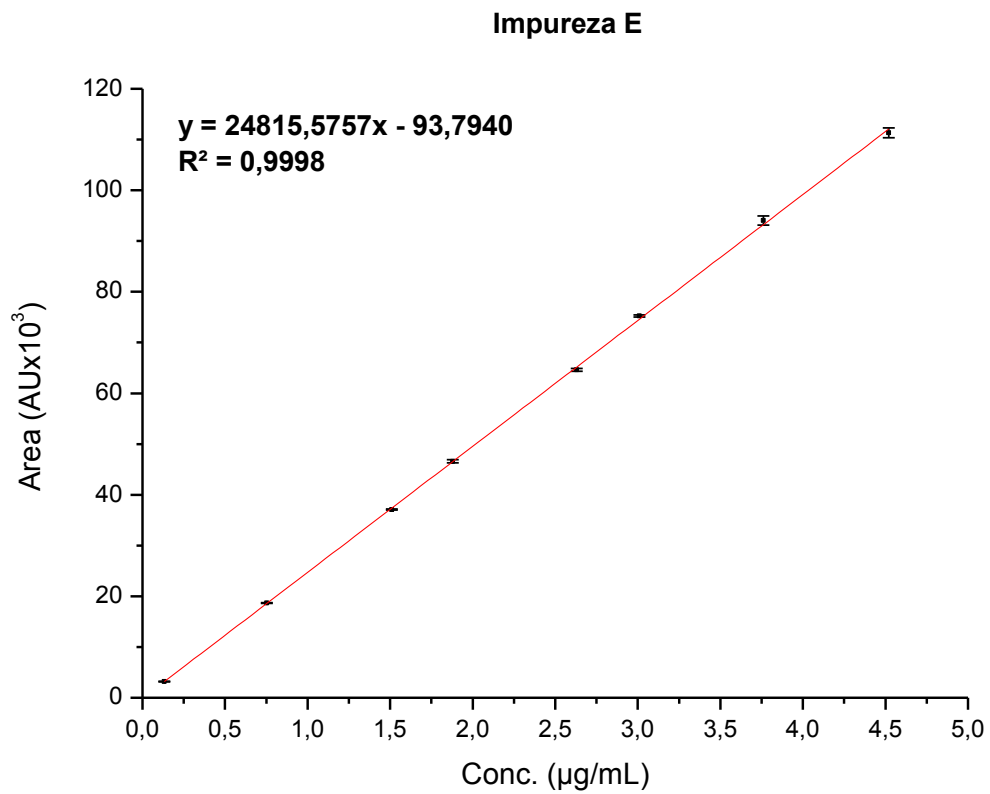


FIGURA 4.13: Curva analítica obtida da impureza E.



Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos das curvas analíticas das três impurezas foram acima de 0,98 e estão representados na TABELA 4.10, juntamente com os valores de LOD, LOQ, e as respectivas equações das curvas geradas. Para todas as impurezas, as precisões expressas pelo coeficiente de variação (CV%) das triplicatas foram inferiores a 2%, e as exatidões apresentaram desvios menores que 2% do valor nominal em todas as concentrações das curvas. A única exceção foi para os limites de quantificação, onde as precisões expressas pelos coeficientes de variação (CV%) das triplicatas obtidos foram de 2,6%; 2,5% e 2,4%; para as impurezas C, D e E, respectivamente. Os resultados obtidos para cada impureza individual são apresentados nas TABELAS 4.11, 4.12 e 4.13. Todos os resultados obtidos estão dentro dos critérios de aceitação adotados para este estudo, de acordo com as literaturas referenciadas,<sup>58; 59; 61; 62; 63</sup> e sumarizadas na TABELA 4.14.

TABELA 4.10: Parâmetros de linearidade, limites de detecção e quantificação do método.

Analito	Faixa de concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Equação da curva	$R^2$	LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Impureza C	0,479 – 5,95	$Y = 22951,01X - 1292,62$	0,9999	0,191	0,479
Impureza D	0,0606 – 2,99	$Y = 25134,43X - 55,29$	0,9998	0,0242	0,0606
Impureza E	0,133 – 4,52	$Y = 24815,58X - 93,79$	0,9998	0,0531	0,133

TABELA 4.11: Exatidão e precisão da curva analítica para a impureza C

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Exatidão (%)	CV (%)
0,479	100	2,6
0,992	102	0,0
1,98	101	1,0
2,48	98,8	0,6
3,47	99,4	0,4
3,97	100	0,8
4,96	101	0,4
5,95	99,8	0,5

TABELA 4.12: Exatidão e precisão da curva analítica para a impureza D

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Exatidão (%)	CV (%)
0,0606	99,0	2,5
0,499	101	0,9
0,998	99,8	0,4
1,25	100	0,8
1,75	98,9	0,6
2,00	101	0,0
2,50	101	0,8
2,99	99,7	1,1

TABELA 4.13: Exatidão e precisão da curva analítica para a impureza E

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Exatidão (%)	CV (%)
0,133	99,2	2,4
0,753	100	0,4
1,51	99,3	0,4
1,88	100	0,5
2,63	99,2	0,6
3,01	101	0,4
3,76	101	1,0
4,52	99,3	0,8

TABELA 4.14: Critério de aceitação para curva analítica.

Parâmetro	Critério de Aceitação
Coeficiente de determinação ( $R^2$ )	$R^2 \geq 0,98$
Coeficiente de variação (CV%)	Concentração do LOQ $\leq 3\%$ Demais concentrações $\leq 2\%$
Exatidão (%)	Concentração do LOQ $\pm 3\%$ Demais concentrações $\pm 5\%$

## Precisão e Exatidão

Os estudos de precisão intra e interdia e exatidão, foram conduzidos com amostras controle de qualidade preparadas em triplicata, em três diferentes concentrações (baixa, média e alta), em relação às concentrações da curva de calibração: 0,574; 2,98; 4,46  $\mu\text{g/mL}$  para a impureza C; 0,0727; 1,50; 2,25  $\mu\text{g/mL}$  para a impureza D; e 0,159; 2,26; 3,39  $\mu\text{g/mL}$  para a impureza E.

A precisão e exatidão intra e interdias do método foram determinadas analisando-se três replicatas dos três controles de qualidade, em dias diferentes. A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) e a exatidão foi calculada através da interpolação dos resultados na equação da reta obtida na curva de calibração e expressa como porcentagem de desvio entre as concentrações nominais e as quantificadas. Os dados estão apresentados nas TABELAS 4.15, 4.16 e 4.17, e os critérios de aceitação são apresentados nas TABELAS 4.18 e 4.19.

TABELA 4.15: Precisão e exatidão intra e interdias para a impureza C

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Dia 1 (n= 3)		Dia 2 (n= 3)		Inter-dias (n = 6)	
	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)
0,574	102	0,4	99,2	0,1	101	1,8
2,98	102	0,7	100	1,4	101	1,2
4,46	101	0,6	101	0,7	101	0,6

TABELA 4.16: Precisão e exatidão intra e interdias para a impureza D

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Dia 1 (n= 3)		Dia 2 (n= 3)		Inter-dias (n = 6)	
	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)
0,0727	103	0,3	97,5	0,7	100	3,1
1,50	101	0,4	101	0,4	101	0,4
2,25	101	0,4	100	0,5	100	0,5

TABELA 4.17: Precisão e exatidão intra e interdias para a impureza E

Concentração (µg/mL)	Dia 1 (n= 3)		Dia 2 (n= 3)		Inter-dias (n = 6)	
	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)
0,159	100	0,0	101	1,3	101	1,0
2,26	100	0,4	101	1,3	100	0,9
3,39	101	0,2	101	0,4	101	0,3

TABELA 4.18: Critério de aceitação para exatidão

Parâmetro	Determinação	Critério de aceitação
Média de exatidão em cada nível de concentração	Exatidão de cada Impureza individual (C, D, ou E)	95,0 a 105%

TABELA 4.19: Critérios de aceitação para precisão

Teste	Determinação	Critério de Aceitação
Precisão intra-dia	9 determinações, 3 diferentes concentrações, 3 replicatas	$CV \leq 5,0\%$
Precisão intermediária (precisão inter-dias)	2 dias diferentes; 18 determinações	$CV \leq 5,0\%$

A precisão das replicatas dos compostos apresentou coeficientes de variação no máximo em 3,1%, considerando-se os resultados obtidos para todos os compostos. Os valores de exatidão variaram entre 97,5 e 103% das concentrações nominais. Portanto, os valores estão dentro dos critérios de aceitação para a quantificação de impurezas. A FIGURA 4.14 ilustra um cromatograma obtido no teste de exatidão.

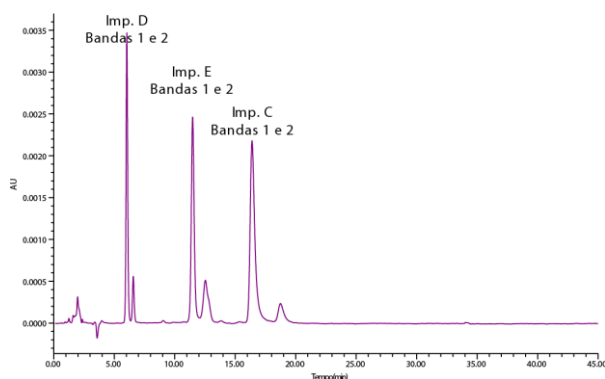


FIGURA 4.14: Cromatograma representativo de solução de controle de qualidade de concentração média, contendo as impurezas C, D e E, nas respectivas concentrações: 2,98; 1,50; e 2,26  $\mu\text{g/mL}$ .

### Robustez do método e estabilidade de soluções analíticas

A robustez foi estudada através da avaliação dos dados a partir de pequenas e deliberadas variações nos parâmetros do método analítico, utilizando-se uma solução contendo as concentrações de 4,89  $\mu\text{g/mL}$  de impureza C, 2,41  $\mu\text{g/mL}$  de impureza D, 3,75  $\mu\text{g/mL}$  de impureza E, e 4,87  $\mu\text{g/mL}$  de iodixanol. As variações compreenderam: temperatura, vazão, composição de fase móvel, força iônica do tampão, pH e diferentes lotes de coluna. Um critério de aceitação foi estabelecido, baseado em níveis aceitáveis de precisão e exatidão de análises por cromatografia líquida ( $\pm 2\%$ ), com o intuito de avaliar se algum parâmetro em específico poderia ser considerado crítico para algum dos compostos. Os resultados de robustez são apresentados na TABELA 4.20.

TABELA 4.20: Parâmetros e resultados obtidos da robustez do método

Atributo	Condição	Exatidão em relação à média da condição padrão de trabalho (%) <sup>(*)</sup>		
		Impureza C	Impureza D	Impureza E
Vazão	0,6 mL/ min	98,6	99,8	100
	1,0 mL/min	98,8	101	101
Temperatura da coluna	15 °C	100	102	101
	25 °C	98,7	101	101
Composição de fase móvel (v/v) (ACN: Solução de ácido fórmico 1 mmol·L <sup>-1</sup> pH 3,2)	90:10	99,1	101	101
	94:06	104	101	98,2
Força iônica (Solução de ácido fórmico (x) mM pH 3,2)	0,8 mM	101	99,8	101
	1,2 mM	101	100	101
pH [Solução de ácido fórmico 1 mmol·L <sup>-1</sup> pH (x)]	3,15	100	100	98,7
	3,25	99,8	100	100
Diferentes lotes de coluna	SN: 522135-33;	100	101	100
	BN: 5568-86			
	SN: 522034-87;	101	100	101
	BN: 5568-86			

<sup>(\*)</sup> critério de aceitação: 98,0 a 102%

De acordo com os resultados obtidos, apenas a condição de composição de fase móvel ACN: Solução de ácido fórmico 1 mmol·L<sup>-1</sup> pH 3,2; 94:06 (v/v) foi considerada crítica para a análise da impureza C.

A estabilidade foi avaliada com a mesma solução analítica estudada na robustez, em temperatura ambiente (20 a 25°C), e a mesma se mostrou estável por 120 horas (TABELA 4.21). O tempo de estudo foi determinado a partir do teste mais longo de validação, ou seja, o tempo de estabilidade de solução deveria ser maior que o teste que demandasse mais tempo de análise.

TABELA 4.21: Parâmetros e resultados obtidos para estabilidade de soluções

Atributo	Tempo (h)	Exatidão em relação à média do tempo zero (%) <sup>(*)</sup>		
		Impureza C	Impureza D	Impureza E
Estabilidade da solução	0 (inicial)	(100)	(100)	(100)
	24	99,2	99,5	99,7
	48	100	100	100
	72	100	100	100
	96	99,6	99,7	99,8
	120	99,5	101	100

<sup>(\*)</sup> critério de aceitação: 98,0 a 102%

### 4.3.2. Validação do método analítico de teor de iodixanol

De forma análoga à validação do método analítico de impurezas conhecidas, o método analítico desenvolvido para a quantificação de teor de iodixanol também foi validado de acordo com as normas preconizadas pela USP 36, capítulo geral <1225> *VALIDATION OF COMPENDIAL PROCEDURES*. As figuras de mérito avaliadas foram adequabilidade de sistema, seletividade, curva analítica, precisão, inter e intradia, exatidão, seletividade, limites de detecção e quantificação, estudos de robustez, e estudos de estabilidade de soluções preparadas. <sup>43; 44; 58; 59</sup>

A análise do teor de iodixanol e a validação foram conduzidas de acordo com as condições cromatográficas descritas anteriormente na TABELA 4.6 (p. 50).

Os intervalos de concentração utilizados na construção das curvas de calibração foram estipulados de acordo com a especificação proposta para a determinação de teor da matéria prima iodixanol por HPLC, uma vez que este tipo de especificação é o mais usual para ensaios cromatográficos, inclusive citado na própria USP 36. <sup>63</sup> Essa especificação é detalhada na TABELA 4.22, bem como a concentração de trabalho adotada.

TABELA 4.22: Especificação proposta para teor de iodixanol por HPLC.

Composto	Especificação	Concentração de trabalho (mg/mL)
Iodixanol	98,0 a 102%	0,2

### Adequabilidade de sistema

A adequabilidade de sistema, conceito já descrito anteriormente (p. 53), é requerida no início de todos os ensaios de quantificação de teor no iodixanol, inclusive na validação do método. A TABELA 4.23 apresenta os resultados obtidos para o teste de adequabilidade de sistema, bem como os critérios de aceitação; utilizando-se uma solução contendo a concentração de 0,200 mg/mL de iodixanol.

Como pode ser observado, os resultados obtidos para o teste de adequabilidade de sistema estão de acordo com os critérios de aceitação adotados.

TABELA 4.23: Parâmetros e resultados obtidos de adequabilidade de sistema.

Parâmetro	Teste	Resultado	Critério de aceitação
Razão de distribuição de massa	Fator de capacidade (k) - Iodixanol (banda principal)	13,3	Não menos que 0,6
Eficiência da coluna	Iodixanol (bandas principais)	10638	Não menos que 2000 pratos/coluna
Precisão do sistema	6 determinações da solução padrão de referência do mesmo preparo (somatória de área das bandas)	0,2%	CV ≤ 2,0%



## Seletividade

A seletividade do método foi avaliada comparando-se análises de diluente, fase móvel, e de amostra (iodixanol). Os cromatogramas obtidos não apresentaram interferentes, conforme pode ser visualizado na FIGURA 4.15. As bandas de Iodixanol apresentaram espectros na região do UV-visível com pureza cromatográfica, indicando que o método é seletivo.

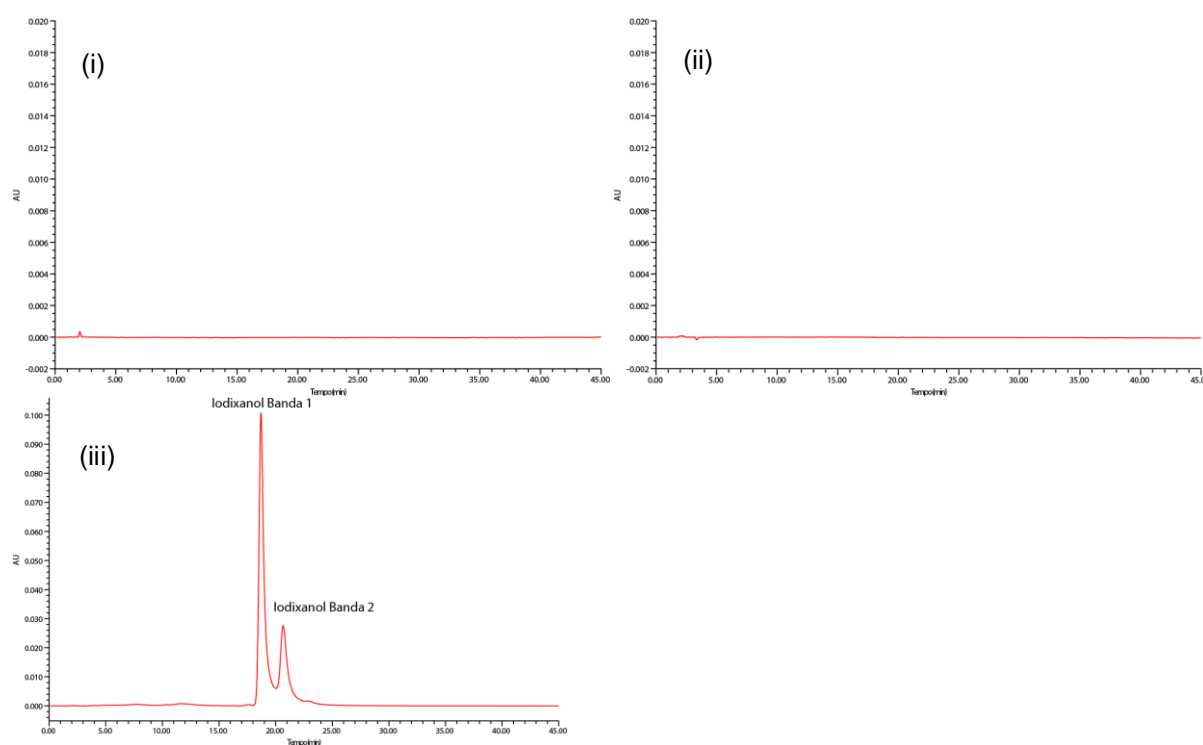


FIGURA 4.15: Cromatogramas representativos do teste de seletividade.

(i) = diluente

(ii) = fase móvel

(iii) = iodixanol (0,200 mg/mL)

## Linearidade

A curva de calibração foi obtida em função das áreas das bandas cromatográficas, relativas às seguintes concentrações: 0,160; 0,180; 0,200; 0,220; 0,240 mg/mL de iodixanol. As amostras foram preparadas em triplicatas e injetadas 10  $\mu$ L para cada concentração.

A curva analítica obtida é apresentada na FIGURA 4.16.

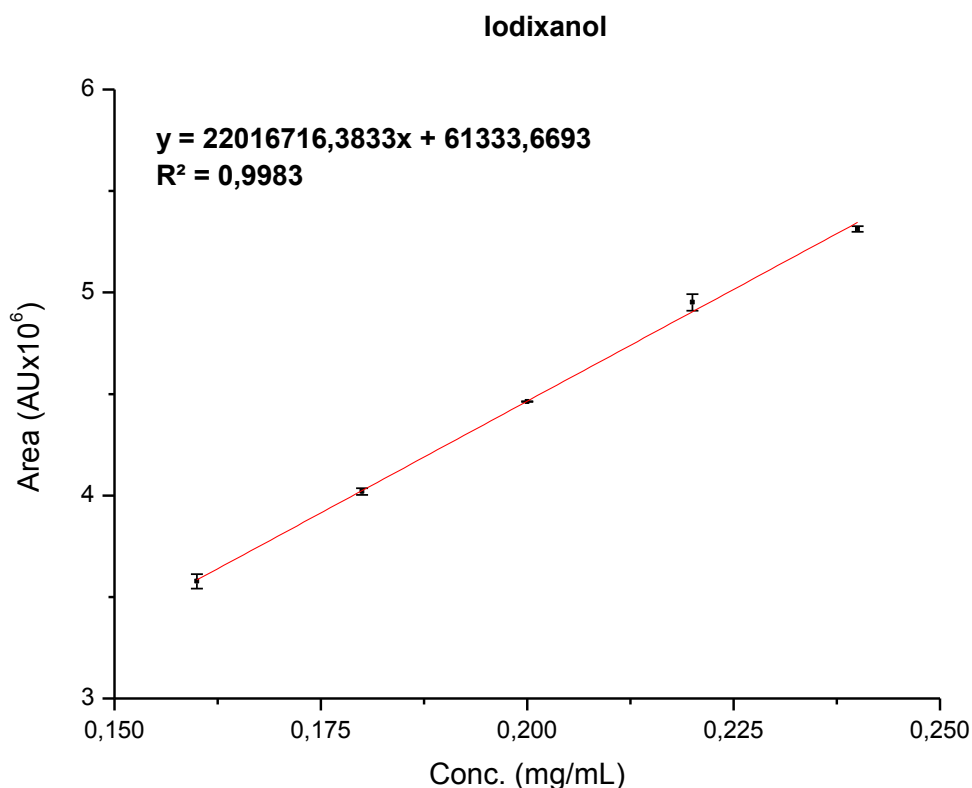


FIGURA 4.16: Curva analítica obtida de teor de iodixanol.

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido da curva analítica foi acima de 0,98 e está representado na TABELA 4.24, juntamente com os valores de LOD e LOQ, e a respectiva equação da curva gerada. Por tratar-se de um ensaio de quantificação de teor, o estudo de LOQ foi conduzido, entretanto, não faz parte da curva analítica. As precisões expressas pelo coeficiente de variação (CV%) das triplicatas foram inferiores a 2%, e as exatidões apresentaram desvios menores que 2% do valor nominal em todas as concentrações da curva. Contudo, para o limite de quantificação, a precisão das triplicatas obtidas foi de 5,5%, para uma solução contendo 0,701  $\mu\text{g/mL}$  de iodixanol, que apresentou uma relação sinal ruído (S/N) de 11:1. Outra solução foi avaliada, de concentração de 1,00  $\mu\text{g/mL}$ , que apresentou precisão das triplicatas de 3,6%, e relação sinal ruído (S/N) de 16:1. Dessa forma, os dois valores de LOQ são apresentados. Os resultados individuais obtidos para o iodixanol são apresentados na TABELA 4.25. Todos os resultados obtidos estão

dentro dos critérios de aceitação adotados para este estudo, de acordo com as literaturas referenciadas,<sup>58; 59; 61; 62; 63</sup> e sumarizadas na TABELA 4.26.

TABELA 4.24: Parâmetros de linearidade e limite de quantificação do método.

Analito	Faixa de concentração (mg/mL)	Equação da curva	R <sup>2</sup>	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Iodixanol	0,160 – 0,240	Y = 22016716,38X + 61333,67	0,9983	0,300	0,701 (S/N = 11:1; CV = 5,5%) 1,00 (S/N = 16:1; CV = 3,6%)

TABELA 4.25: Exatidão e precisão da curva analítica para o iodixanol

Concentração (µg/mL)	Exatidão (%)	CV (%)
0,160	100	1,1
0,180	100	0,6
0,200	100	0,0
0,220	101	0,9
0,240	99,2	0,2

TABELA 4.26: Critério de aceitação para curva analítica.

Parâmetro	Critério de Aceitação
Coeficiente de determinação (R <sup>2</sup> )	r <sup>2</sup> ≥ 0,98
Coeficiente de variação (CV%)	CV ≤ 2%
Exatidão (%)	± 2%

## Precisão e Exatidão

Os estudos de precisão intra e interdia e exatidão, foram conduzidos com amostras controle de qualidade preparadas em triplicata, em três diferentes concentrações (baixa, média e alta), em relação às concentrações da curva de calibração: 0,175; 0,216; 0,236 mg/mL para o iodixanol.

A precisão e exatidão intra e interdias do método foram determinadas analisando-se três replicatas dos três controles de qualidade, em dias diferentes. A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) e a exatidão foi calculada através da interpolação dos resultados na equação da reta obtida na curva de calibração e expressa como porcentagem de desvio entre as concentrações nominais e as quantificadas. Os dados estão apresentados na TABELA 4.27 e os critérios de aceitação são apresentados nas TABELAS 4.28 e 4.29.

TABELA 4.27: Precisão e exatidão intra e interdias para o iodixanol

Concentração (mg/mL)	Dia 1 (n= 3)		Dia 2 (n= 3)		Inter-dias (n = 6)	
	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)
0,175	98,9	0,6	99,4	0,0	99,4	0,5
0,216	101	0,3	101	0,5	101	0,4
0,236	100	0,6	99,0	0,2	99,6	0,8

TABELA 4.28: Critério de aceitação para exatidão

Parâmetro	Determinação	Critério de aceitação
Média de exatidão em cada nível de concentração	Exatidão	98,0 a 102%

TABELA 4.29: Critérios de aceitação para precisão

Teste	Determinação	Critério de Aceitação
Precisão intra-dia	9 determinações, 3 diferentes concentrações, 3 replicatas	$CV \leq 2,0\%$
Precisão intermediária (precisão inter-dias)	2 dias diferentes; 18 determinações	$CV \leq 2,0\%$

A precisão das replicatas apresentou coeficientes de variação no máximo de 0,8%. Os valores de exatidão variaram entre 98,9 e 101% das concentrações nominais. Portanto, os valores estão dentro dos critérios de aceitação para a quantificação de teor.

### **Robustez do método e estabilidade de soluções analíticas**

A robustez foi estudada através da avaliação dos dados a partir de pequenas e deliberadas variações nos parâmetros do método analítico, utilizando-se uma solução contendo a concentração de 0,204 mg/mL de iodixanol. As variações compreenderam: temperatura, vazão, composição de fase móvel, força iônica do agente tamponante, pH e diferentes lotes de coluna. Um critério de aceitação foi estabelecido, baseado em níveis aceitáveis de precisão e exatidão de análises por cromatografia líquida ( $\pm 2\%$ ), com o intuito de avaliar se algum parâmetro em específico poderia ser considerado crítico. Os resultados de robustez são apresentados na TABELA 4.30.

TABELA 4.30: Parâmetros e resultados obtidos da robustez do método

Atributo	Condição	Exatidão em relação à média da condição padrão de trabalho (%) <sup>(*)</sup> Iodixanol
Vazão	0,6 mL/ min	100
	1,0 mL/min	101
Temperatura da coluna	15 °C	102
	25 °C	101
Composição de fase móvel (v/v) (ACN: Solução de ácido fórmico 1 mmol·L <sup>-1</sup> pH 3,2)	90:10	99,0
	94:06	100
Força iônica [Solução de ácido fórmico (x) mmol·L <sup>-1</sup> pH 3,2]	0,8 mM	101
	1,2 mM	101
pH [Solução de ácido fórmico 1 mmol·L <sup>-1</sup> pH (x)]	3,15	101
	3,25	102
Diferentes lotes de coluna	SN: 522135-33; BN: 5568-86	100
	SN: 522034-87; BN: 5568-86	100

<sup>(\*)</sup> critério de aceitação: 98,0 a 102%

De acordo com os resultados obtidos, nenhuma condição foi considerada crítica para a análise de teor de iodixanol.

A estabilidade foi avaliada com a mesma solução analítica estudada na robustez, em temperatura ambiente (20 a 25°C), e a mesma se mostrou estável por 120 horas (TABELA 4.31). O tempo de estudo foi determinado a partir do teste mais longo de validação, ou seja, o tempo de estabilidade de solução deveria ser maior que o teste que demandasse mais tempo de análise.

TABELA 4.31: Parâmetros e resultados obtidos para estabilidade de soluções

Atributo	Tempo (h)	Exatidão em relação à média
		do tempo zero (%) <sup>(*)</sup>
		Iodixanol
	0 (inicial)	100
Estabilidade da solução	24	98,7
	48	99,0
	72	100
	96	100
	120	100

<sup>(\*)</sup> critério de aceitação: 98,0 a 102%

#### 4.4. Aplicação dos métodos

A aplicação dos métodos de impurezas e de teor foi demonstrada a partir da análise de três diferentes lotes de amostras de matéria prima iodixanol. Os resultados obtidos na quantificação das impurezas C, D e E, bem como o teor de iodixanol nessas amostras são apresentados na TABELA 4.32.

TABELA 4.32: Análise de impurezas C, D e E, e teor em três diferentes lotes de amostras de matéria prima iodixanol.

Amostra	Impureza C (%)	Impureza D (%)	Impureza E (%)	Teor (%)
Lote #1	Não detectado	Não detectado	0,02	100
Lote #2	Não detectado	Não detectado	0,07	100
Lote #3	Não detectado	Não detectado	0,10	97,0

Para os resultados de quantificação de impurezas, todos os lotes atenderam às especificações descritas na TABELA 4.8 (p. 52). Na quantificação de teor, observou-se que os lotes #1 e #2 atendem à especificação proposta na TABELA 4.22 (p. 65), enquanto que o lote #3 encontra-se fora de especificação.

Com relação ao lote# 3 foi relatado, no certificado do fabricante, um resultado de pureza de 95% do material em questão. Portanto, foi efetuada uma investigação do conteúdo de água por titulação potenciométrica (Karl Fischer) deste lote, sendo encontrado o valor de 3,36% (m/m) de teor de água no mesmo. O resultado de conteúdo de água encontra-se de acordo com o especificado no compêndio da USP 36 (máximo 4,0% m/m de água). Dessa forma, é justificado o resultado de teor encontrado para este lote.

A FIGURA 4.17 representa os cromatogramas obtidos das amostras dos lotes #1, 2 e 3 para a quantificação de teor. O cromatograma do lote #1 representado foi obtido com uma solução de concentração de amostra de 0,200 mg/mL, o cromatograma do lote #2 representado foi obtido com uma solução de concentração de amostra de 0,198 mg/mL, enquanto que para o cromatograma do lote #3 representado foi obtido com uma solução de concentração de amostra de 0,209 mg/mL.

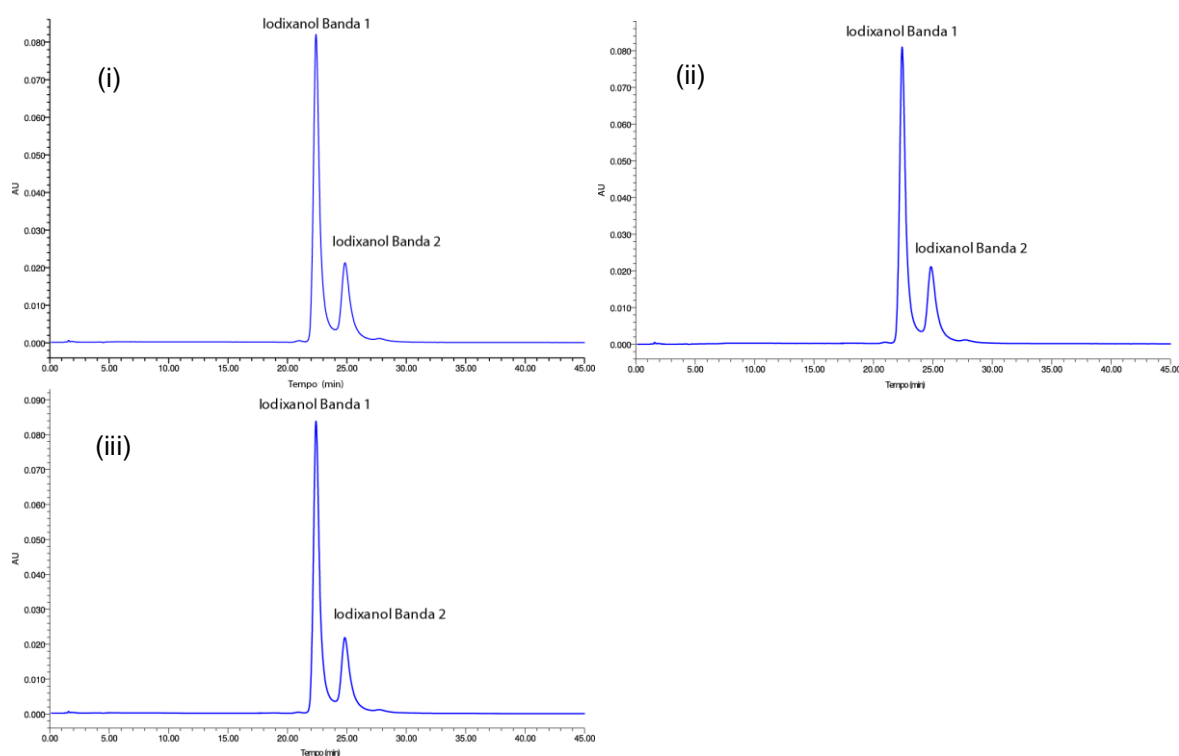


FIGURA 4.17: Cromatogramas representativos de soluções amostra de iodixanol na quantificação de teor.

(i) = lote #1

(ii) = lote #2

(iii) = lote #3



As amostras foram quantificadas através de uma curva de calibração obtida em função das áreas das bandas cromatográficas, relativas às seguintes concentrações: 0,172; 0,212 e 0,232 mg/mL para o iodixanol.

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido da curva analítica foi acima de 0,98 e está representado na TABELA 4.33, juntamente com a respectiva equação da curva gerada.

TABELA 4.33: Parâmetros da curva analítica obtida na aplicação do método de teor.

<b>Analito</b>	<b>Faixa de concentração (mg/mL)</b>	<b>Equação da curva</b>	<b><math>R^2</math></b>
Iodixanol	0,172 – 0,232	$Y = 23087114X - 385764$	0,9999

A FIGURA 4.18 representa os cromatogramas obtidos das amostras dos lotes #1, 2 e 3 para a análise de impurezas C, D e E. O cromatograma do lote #1 representado foi obtido com uma solução de concentração de amostra de 1,19 mg/mL, o cromatograma do lote #2 representado foi obtido com uma solução de concentração de amostra de 1,20 mg/mL, enquanto que para o cromatograma do lote #3 representado foi obtido com uma solução de concentração de amostra de 1,20 mg/mL.

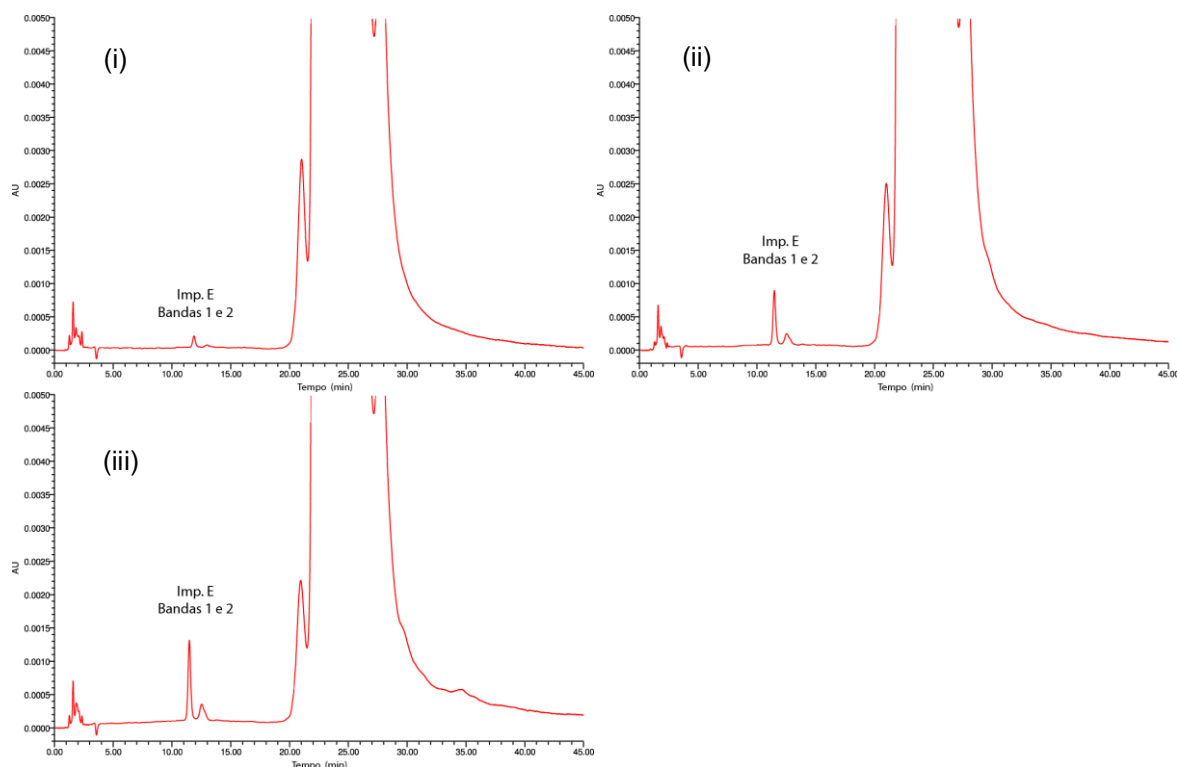


FIGURA 4.18: Cromatogramas representativos de soluções amostra de iodixanol na quantificação de impurezas conhecidas.

(i) = lote #1

(ii) = lote #2

(iii) = lote #3

A quantificação de impurezas conhecidas nas amostras foi conduzida de forma análoga ao teor, através de curvas de calibrações obtidas em função das áreas das bandas cromatográficas, relativas às seguintes concentrações: 0,580; 3,02; 4,52  $\mu\text{g/mL}$  para a impureza C; 0,0727; 1,48; 2,23  $\mu\text{g/mL}$  para a impureza D; e 0,161; 2,24; 3,27  $\mu\text{g/mL}$  para a impureza E.

Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos das curvas analíticas das três impurezas foram acima de 0,98 e estão representados na TABELA 4.34, juntamente com as respectivas equações das curvas geradas.

TABELA 4.34: Parâmetros das curvas analíticas obtidas na aplicação do método de impurezas conhecidas.

<b>Analito</b>	<b>Faixa de concentração (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Equação da curva</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
Impureza C	0,580 – 4,52	$Y = 18124,08X + 0,27$	0,9999
Impureza D	0,0727 – 2,23	$Y = 25364,53X + 70,50$	1,0000
Impureza E	0,161 – 3,27	$Y = 24078,15X + 95,00$	1,0000

As amostras foram, então, quantificadas de acordo com as respectivas equações geradas para as análises de impurezas e de teor.

## 5. CONCLUSÕES

O método desenvolvido e validado neste presente trabalho apresentou conformidade com as normas preconizadas pela USP 36<sup>44</sup> e com os critérios estabelecidos. Com os resultados de precisão e exatidão obtidos, podemos concluir que o mesmo é eficaz tanto para a análise de impurezas conhecidas, C, D e E, bem como para a quantificação de teor na matéria-prima iodixanol.

A coluna *fused-core* utilizada mostrou-se eficaz para as referidas análises, demonstrando sua capacidade de alta eficiência mesmo em sistemas convencionais de HPLC, condizente com a ótima transferência de massas característica deste tipo de coluna analítica.

Foram avaliados os modos de eluição reverso e por interação hidrofílica (HILIC). A avaliação no modo reverso foi conduzida com colunas de diferentes seletividades e o uso de triângulo de seletividade de solventes foi aplicado, sendo os solventes utilizados metanol, acetonitrila e THF. Entretanto, não se atingiu a seletividade desejada no modo reverso, devido ao fato dos compostos apresentarem fatores de retenção próximos. Por outro lado, na avaliação do modo HILIC, o método desenvolvido apresentou boa seletividade.

Os métodos desenvolvidos podem ser facilmente transferidos para detecção por espectrometria de massas (LC/MS), uma vez que as condições cromatográficas são compatíveis.

Este trabalho reporta, pela primeira vez, um método de análise das impurezas C, D e E na matéria-prima iodixanol em uma única corrida cromatográfica. O método de teor desenvolvido apresenta vantagens em relação ao descrito na monografia de iodixanol da USP 36,<sup>57</sup> uma vez que o mesmo consiste de uma titulação potenciométrica ao invés de um método cromatográfico, com o benefício de ser mais seletivo.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. VISIPAQUE - iodixanol injection, solution. 2009. Disponível em: < <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?id=9704> >. Acesso em: 29/Abr/2013.
2. PRIEBE, H.; DUGSTAD, H.; HEGLUND, I. F.; SANDE, R. & TØNSETH, C. P. "Synthesis, Analysis and Toxicity of Three Compounds Formed during the Synthesis of Iodixanol". *Acta Chemica Scandinavica*, 49 737, 1995.
3. COELHO, T. H. & MOREIRA, A. L. "Fisiologia Das Membranas Celulares – Aula Teórico-Prática – Texto de apoio". Faculdade de Medicina da Universidade do Porto – Serviço de Fisiologia, 1, 2002.
4. JACOBSEN, P. B.; LARSEN, Å.; KONARBOLAND, R. & SKOTLAND, T. "Biotransformation of Nonionic X-Ray Contrast Agents In Vivo and In Vitro". *Drug Metabolism and Disposition*, 27 (10): 1205, 1999.
5. MCMURRY, J. Dienes Conjugados e Espectroscopia de Ultravioleta. In: J. McMurry Química Orgânica. 4ª edição. Tradução de: SILVA, L. M. P. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 1997. Volume 1, 14. p. 476-510. Título original: *Organic Chemistry*, 4th edition.
6. PRIEBE, H.; AUKRUST, A.; BJØRSVIK, H. R.; TØNSETH, C. P. & WIGGEN, U. N. "Stability of the X-ray contrast agent iodixanol=3,3',5,5'-tetrakis(2,3-dihydroxypropylcarbonyl)-2,2',4,4',6,6'-hexaiodo-N,N'-(2-hydroxypropane-1,3-diyl)-diacetanilide towards acid, base, oxygen, heat and light". *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 24 (3): 227, 1999.
7. B2. Preparation of iodixanol. *United States Patent Homestad*. USA 2005.
8. Process for the preparation of contrast agents. *United States Patent Homestad*. USA. US 5840967 1998.
9. CHITNIS, S. D. & AKHLAGHI, F. "Development and validation of an HPLC-UV method for iodixanol quantification in human plasma". *Journal of Chromatography B*, 869 (1–2): 133, 2008.
10. DENIS, M. C.; VENNE, K.; LESIÈGE, D.; FRANCOEUR, M.; GROLEAU, S.; GUAY, M.; CUSSON, J. & FURTOS, A. "Development and evaluation of a liquid chromatography–mass spectrometry assay and its application for the assessment of renal function". *Journal of Chromatography A*, 1189 (1–2): 410, 2008.
11. PELLETT, J.; LUKULAY, P.; MAO, Y.; BOWEN, W.; REED, R.; MA, M.; MUNGER, R. C.; DOLAN, J. W.; WRISLEY, L.; MEDWID, K.; TOLTL, N. P.; CHAN, C. C.; SKIBIC, M.; BISWAS, K.; WELLS, K. A. & SNYDER, L. R. "Orthogonal" separations for reversed-phase liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*, 1101 (1–2): 122, 2006.
12. DOLAN, J. W. & SNYDER, L. R. "Selecting an "orthogonal" column during high-performance liquid chromatographic method development for samples that may contain non-ionized solutes". *Journal of Chromatography A*, 1216 (16): 3467, 2009.

13. UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION - USP36–NF31 Official 8/1/13 - 11/30/13, *General Chapter: <467> RESIDUAL SOLVENTS*, 2013.
14. SCHOENMAKERS, P.; MARRIOTT, P. & BEENS, J. "Nomenclature and conventions in comprehensive multidimensional chromatography ". *LCGC Europe*, 25 (5): 1, 2003.
15. RODGERS, J. L.; NICEWANDER, W. A. & TOOTHAKER, L. "Linearly Independent, Orthogonal, and Uncorrelated Variables". *The American Statistician*, 38 (2): 133, 1984.
16. JOHNSON, A. R. & VITHA, M. F. "Chromatographic selectivity triangles". *Journal of Chromatography A*, 1218 (4): 556, 2011.
17. SNYDER, L. R.; CARR, P. W. & RUTAN, S. C. "Solvatochromically based solvent-selectivity triangle". *Journal of Chromatography A*, 656 (1–2): 537, 1993.
18. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. & GLAJCH, J. L. *Basics of Separation*. In: *Practical HPLC Method Development*, 2nd edition. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1997. Volume 1, 2. p. 21-58.
19. MARCHAND, D. H.; SNYDER, L. R. & DOLAN, J. W. "Characterization and applications of reversed-phase column selectivity based on the hydrophobic-subtraction model". *Journal of Chromatography A*, 1191 (1-2): 2, 2008.
20. SNYDER, L. R. "A New Look at the Selectivity of RPC Columns". *Analytical Chemistry*, 79 (9): 3254, 2007.
21. MARCHAND, D. H. & SNYDER, L. R. "Anion-exchange behavior of several alkylsilica reversed-phase columns". *Journal of Chromatography A*, 1209 (1–2): 104, 2008.
22. MARCHAND, D. H.; CROES, K.; DOLAN, J. W. & SNYDER, L. R. "Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography: VII. Cyanopropyl columns". *Journal of Chromatography A*, 1062 (1): 57, 2005.
23. CARR, P. W.; DOLAN, J. W.; NEUE, U. D. & SNYDER, L. R. "Contributions to reversed-phase column selectivity. I. Steric interaction". *Journal of Chromatography A*, 1218 (13): 1724, 2011.
24. MARCHAND, D. H.; CARR, P. W.; MCCALLEY, D. V.; NEUE, U. D.; DOLAN, J. W. & SNYDER, L. R. "Contributions to reversed-phase column selectivity. II. Cation exchange". *Journal of Chromatography A*, 1218 (40): 7110, 2011.
25. SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W. & CARR, P. W. "The hydrophobic-subtraction model of reversed-phase column selectivity". *Journal of Chromatography A*, 1060 (1–2): 77, 2004.
26. UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION USP Column Equivalency Application – PQRI Database. 2013. Disponível em: <<http://www.usp.org/app/USPNF/columnsDB.html>>. Acesso em: 26/Out/2013.
27. UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION - USP36–NF31 Official 8/1/13 - 11/30/13, *Reagents: Chromatographic Columns*, 2013.

28. SIELC - HILIC. 2013. Disponível em: < [http://www.sielc.com/Technology\\_HILIC.html](http://www.sielc.com/Technology_HILIC.html) >. Acesso em: 30/Abr/2013.
29. XU, R. N.; FAN, L.; RIESER, M. J. & EL-SHOUBAGY, T. A. "Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC–MS/MS". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44 (2): 342, 2007.
30. TOLSTIKOV, V. V. & FIEHN, O. "Analysis of Highly Polar Compounds of Plant Origin: Combination of Hydrophilic Interaction Chromatography and Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry". *Analytical Biochemistry*, 301 (2): 298, 2002.
31. IDBORG, H.; ZAMANI, L.; EDLUND, P.-O.; SCHUPPE-KOISTINEN, I. & JACOBSSON, S. P. "Metabolic fingerprinting of rat urine by LC/MS: Part 1. Analysis by hydrophilic interaction liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry". *Journal of Chromatography B*, 828 (1–2): 9, 2005.
32. SHOU, W. Z. & NAIDONG, W. "Simple means to alleviate sensitivity loss by trifluoroacetic acid (TFA) mobile phases in the hydrophilic interaction chromatography–electrospray tandem mass spectrometric (HILIC–ESI/MS/MS) bioanalysis of basic compounds". *Journal of Chromatography B*, 825 (2): 186, 2005.
33. BUSZEWSKI, B. & NOGA, S. "Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402 (1): 231, 2012.
34. HEMSTRÖM, P. & IRGUM, K. "Hydrophilic interaction chromatography". *Journal of Separation Science*, 29 (12): 1784, 2006.
35. Waters - Atlantis HILIC columns. 2013. Disponível em: < [http://www.waters.com/waters/pt\\_BR/Atlantis-Columns/nav.htm?cid=513211&locale=pt\\_BR](http://www.waters.com/waters/pt_BR/Atlantis-Columns/nav.htm?cid=513211&locale=pt_BR) >. Acesso em: 09/Jun/2013.
36. DINH, N. P.; JONSSON, T. & IRGUM, K. "Probing the interaction mode in hydrophilic interaction chromatography". *Journal of Chromatography A*, 1218 (35): 5880, 2011.
37. IKEGAMI, T.; TOMOMATSU, K.; TAKUBO, H.; HORIE, K. & TANAKA, N. "Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography". *Journal of Chromatography A*, 1184 (1–2): 474, 2008.
38. JANDERA, P. "Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review". *Analytica Chimica Acta*, 692 (1–2): 1, 2011.
39. KNOX, J. H. & SCOTT, H. P. "B and C terms in the Van Deemter equation for liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*, 282 (0), 1983.
40. SALISBURY, J. J. "Fused-Core Particles: A Practical Alternative to Sub-2 Micron Particles". *Journal of Chromatographic Science*, 46 (10): 883, 2008.
41. VAN DEEMTER, J. J.; ZUIDERWEG, F. J. & KLINKENBERG, A. "Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography". *Chemical Engineering Science*, 5 (6), 1956.
42. Phenomenex - Kinetex 1.7 & 2.6  $\mu\text{m}$  Core-Shell Technology. 2013. Disponível em: < <http://www.phenomenex.com/kinetex> >. Acesso em: 01/Mai/2013.

43. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) - ICH Harmonised Tripartite Guideline - Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1), Q2(R1) - Current Step 4 version, 2005.
44. UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION - USP36–NF31 Official 8/1/13 - 11/30/13, *General Chapter: <1225> VALIDATION OF COMPENDIAL PROCEDURES*, 2013.
45. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. & GLAJCH, J. L. Practical HPLC Method Development. 2nd edition. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1997.
46. CASS, Q. B. & DEGANI, A. L. G. 8. OTIMIZAÇÃO. In. Desenvolvimento de Métodos por HPLC: Fundamentos, Estratégias e Validação. São Carlos: EdUFSCar, 2010. Volume 1, 8. p. 35-39.
47. ChemSpider The free chemical database. 2013. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/>>. Acesso em: 30/Abr/2013.
48. ACD/ChemSketch (Freeware) Release: 12.00. Product Version: 12.01. (Build 38526, 26Feb10). 2010. Disponível em: <[www.acdlabs.com](http://www.acdlabs.com)>. Acesso em: 09/Jun/2013.
49. Phenomenex - HILIC Method Development Guidelines. 2013. Disponível em: <<http://www.phenomenex.com/>>. Acesso em: 09/Jun/2013.
50. Sigma Aldrich - Ascentis Express HILIC Guide. 2013. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/>>. Acesso em: 09/Jun/2013.
51. Phenomenex - Explore Luna HILIC. 2011. Disponível em: <<http://www.phenomenex.com/>>. Acesso em: 09/Jun/2013.
52. HALO HILIC Column - General Information. 2013. Disponível em: <<http://www.hichrom.com/>>. Acesso em: 26/Out/2013.
53. KNAUER HILIC method development guidelines. 2013. Disponível em: <[www.knauer.net](http://www.knauer.net)>. Acesso em: 26/Out/2013.
54. Method Development Tools Used in Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) for the analysis of Polar Basic Pharmaceuticals, Agilent Technologies. 2009.
55. GRECO, G. & LETZEL, T. "Main Interactions and Influences of the Chromatographic Parameters in HILIC Separations". *Journal of Chromatographic Science*, 2013.
56. Advantages and Disadvantages of HILIC; a Brief Overview. *Chromatography Today*: <<http://www.chromatographytoday.com/>>, 2012. Volume 5, p. 44-47.
57. UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION - USP36–NF31 Official 8/1/13 - 11/30/13, *USP Monographs: lodixanol*, 2013.
58. Orientação sobre validação de métodos analíticos - Documento de caráter orientativo, ACREDITAÇÃO, INMETRO. DOQ-CGCRE-008 Revisão 04 – JUL/2011 p. 1-19.



59. CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V. & CASS, Q. B. "Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas". *Química Nova*, 32 1021, 2009.

60. UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION - USP36–NF31 Official 8/1/13 - 11/30/13, *General Chapter: <621> CHROMATOGRAPHY*, 2013.

61. AOAC International - AOAC Guidelines for Single Laboratory - Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, 2002.

62. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, Brasil. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, ANVISA.

63. UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION - USP–MEDICINES COMPENDIUM, *General Chapter: <10> Assessing Validation Parameters for Reference and Acceptable Procedures*, 2013.