



Application Note AN-D-003

Controllo di qualità dei concentrati per dialisi

Analisi completa di anioni, acetato e cationi mediante IC

L'emodialisi è un trattamento medico applicato per sostenere la vita quando le funzioni renali diminuiscono e le capacità di disintossicazione endogena dei reni falliscono [1,2]. I liquidi per dialisi (soluzioni per emodialisi), composti da elettroliti, tamponi e carboidrati (glucosio) identici al sangue, sono un elemento centrale di questo trattamento [1,3–5]. Il gradiente di diffusione tra il sangue e il liquido di dialisi consente la rimozione delle scorie

metaboliche e la normalizzazione del contenuto di elettroliti [1,2]. I liquidi per dialisi vengono preparati aggiungendo all'acqua concentrati che contengono elettroliti, carboidrati e tamponi. Questi richiedono gli standard più elevati per la produzione e la preparazione in loco, specificati ad esempio dalla Farmacopea Europea, ISO 11663, ISO 23500 o ISO 13958 (per concentrati per emodialisi) [1,2,4]. La spettroscopia di assorbimento atomico (AAS) viene

spesso utilizzata per scopi di controllo della qualità, ma è limitata ai componenti cationici (metallici) e a un numero limitato di analiti determinati contemporaneamente. La cromatografia ionica (IC) è una soluzione automatizzata, veloce e sensibile per quantificare accuratamente i componenti cationici e anionici, compreso l'acetato, simultaneamente. Questo approccio completo rende l'IC un'alternativa

I liquidi per dialisi devono imitare da vicino la composizione del plasma sanguigno per rimuovere i componenti tossici dal sangue per diffusione. Questi fluidi sono tipicamente composti da acqua, elettroliti che forniscono cationi e anioni (p. es., sodio, potassio, calcio, cloruro), tamponi (p. es., acetato o carbonato) e carboidrati (p. es., glucosio) [1,3–5]. In questo esempio applicativo, il contenuto di cationi, anioni e acetato è stato analizzato in due concentrati per emodialisi (**Tabella 1**). Risultati ottimali sono stati ottenuti con una diluizione nell'intervallo da 1:500 a 1:750 utilizzando acqua ultrapura (UPW).

economica alle tradizionali tecniche analitiche per il controllo della qualità di soluzioni farmaceutiche come i concentrati per emodialisi. La facilità d'uso, la precisione e le elevate capacità di elaborazione dei circuiti integrati aumentano la produttività e soddisfano le esigenze dei moderni laboratori di routine e di ricerca.

I concentrati per dialisi sono stati forniti da MTN Neubrandenburg GmbH, una società Nipro, un affermato produttore di prodotti per emodialisi di alta qualità. Entrambi erano concentrati acidi (A-concentrati) per bicarbonato dialisi con diverse composizioni (**Tabella 1**). La produzione di tali concentrati è soggetta a rigidi criteri di qualità standardizzati come ad esempio ISO 13958, ISO 11663 e ANSI/AAMI RD 61:2000 [1]. Norme rigorose si applicano anche agli altri componenti necessari per la preparazione del liquido di dialisi finale, compresa l'acqua e i concentrati di base (concentrati B) [1,3–5].

ANALISI

Anioni e cationi sono stati analizzati con una configurazione IC a doppio canale (**Figura 1**) utilizzando il rilevamento della conducibilità (soppresso in sequenza per gli anioni). È inoltre

possibile utilizzare un rivelatore UV/VIS (rivelatore UV/VIS 947 Professional Vario) per escludere contaminazioni da nitriti, nitrati e bromuro nei concentrati.

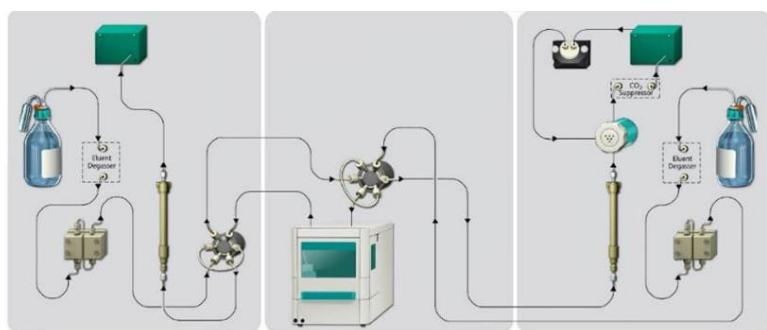


Figura 1. Percorso del flusso per un sistema IC Metrohm a doppio canale. L'iniezione è stata eseguita utilizzando Sample Center – freddo (al centro). La conduttività non soppressa è stata utilizzata per il rilevamento dei cationi, mentre gli anioni sono stati rilevati con conduttività soppressa e UV (205 nm).

Queste impurità possono essere determinate con elevata precisione e sensibilità anche in presenza di elevate concentrazioni di cloruri (Tabella 1). I test delle prestazioni del metodo con concentrati addizionati di nitrati e nitriti hanno prodotto recuperi del 90–110%.

Tabella 1. Composizione (media e range) di due concentrati di acido per emodialisi testati (concentrati A) secondo il produttore.

A-concentrato	#293	#570
Sodio (mol/l)	3,61 (3,51–3,70)	4,64 (4,52–4,75)
Potassio (mmol/L)	70,00 (66,50–73,50)	90,00 (85,50–94,50)
Magnesio (mmol/L)	17,50 (16,63–18,37)	22,50 (21,38–23,62)
Calcio (mmol/L)	52,50 (49,88–55,12)	56,25 (53,44–59,06)
Cloruro (mol/L)	3,82 (3,62–4,01)	4,88 (4,64–5,13)
Acido acetico (mol/L)	0,11 (0,10–0,11)	0,14 (0,13–0,14)
Glucosio (g/L)	35,00 (33,25–36,75)	45,00 (42,75–47,75)

Il sistema completo (Figura 1) era controllato dal software Waters EmpowerTM 3. Un autocampionatore refrigerato (889 IC Sample Center – freddo) è stato utilizzato per estendere la stabilità dei campioni altamente diluiti.

Gli anioni sono stati separati usando la colonna Metrosep A Supp 19 - 150/4.0 (eluente standard e portata, Figura 2 A, C). Questa colonna IC ad alta capacità mostra eccellenti capacità di separazione, anche per matrici altamente caricate.

Le proprietà uniche della colonna Metrosep A Supp 19 consentono un'adeguata separazione e quantificazione dell'acetato anche in presenza di elevate concentrazioni di cloruro. Oltre ad acetato (0,4–20 mg/L) e cloruro (6–300 mg/L), la calibrazione del sistema includeva fluoruro (0,02–1 mg/L), nitrito e bromuro (0,04–2 mg/L), così come nitrati, fosfati e

solfati (0,2–10 mg/l).

I cationi sono stati separati usando la colonna Metrosep C 6 - 150/4,0 (eluente standard, portata: 1,3 mL/min, Figura 2 B). La calibrazione del catione è stata eseguita per sodio (4–200 mg/L), ammonio (0,02–1 mg/L) e potassio, calcio e magnesio (0,2–10 mg/L). La speciale chimica della colonna del Metrosep C 6 garantisce risoluzioni di picco ottimali e consente la quantificazione di basse concentrazioni di analiti (es. ammonio) che eluiscono vicino a componenti più altamente concentrati (es. sodio).

Anioni e cationi sono stati analizzati simultaneamente dallo stesso campione in meno di 25 minuti (figura 2). La robustezza di entrambe le colonne di separazione consente portate elevate, velocizzando il tempo di esecuzione complessivo.

RISULTATI

Una sintesi dei risultati, inclusi i recuperi calcolati rispetto ai valori del produttore, è riportata in Tabella 2. Deviazioni standard relative (RSD) inferiori all'1% per anioni e cationi per misurazioni ripetute del

campione rivelano un'adeguata ripetibilità del metodo. I recuperi calcolati in base ai dati del produttore sono scesi tra il 91 e il 106% per tutti gli analiti (Tabelle 1 e 2).

I componenti principali dei concentrati A testati sono sodio e cloruro, corrispondenti alle principali frazioni nel plasma sanguigno, rispettivamente con 136–145 mEq/L e 98–106 mEq/L [2]. Tuttavia, questo dimostra anche che questi concentrati sono soluzioni altamente saline, analiticamente impegnative e spesso richiedono fasi di eliminazione della matrice

per un'accurata determinazione dell'analita. Quando sono presenti in alte concentrazioni, sia il sodio che il cloruro possono sovrapporsi ai picchi vicini (ad es. acetato, nitrito o ammonio) rendendo impossibile la loro quantificazione o sovraccaricando la colonna, con conseguente allargamento del picco e sostanziali variazioni del tempo di ritenzione.

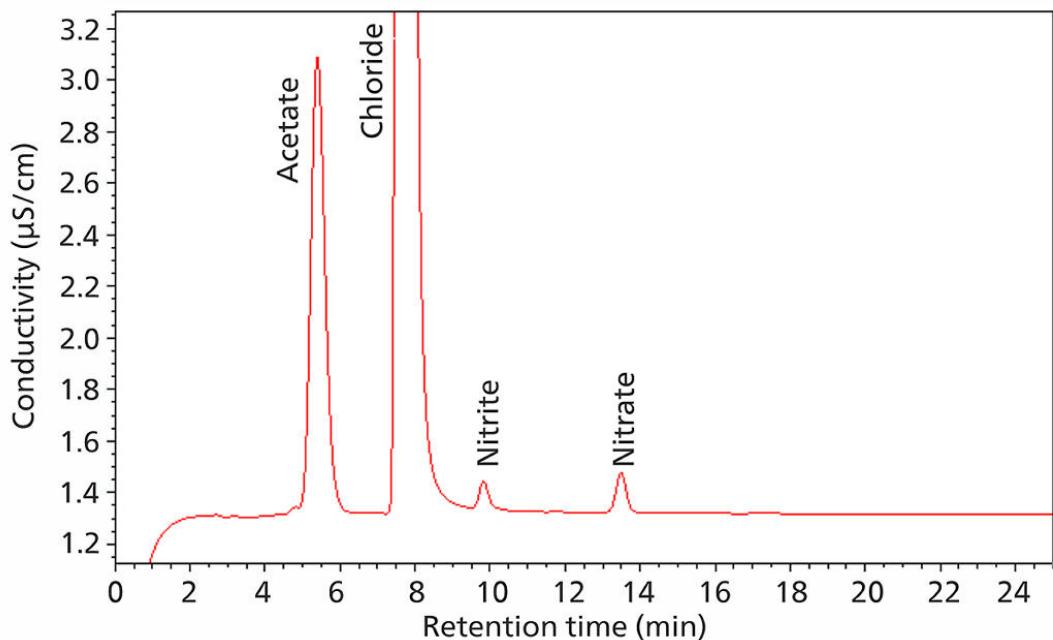


Figure 2 A.

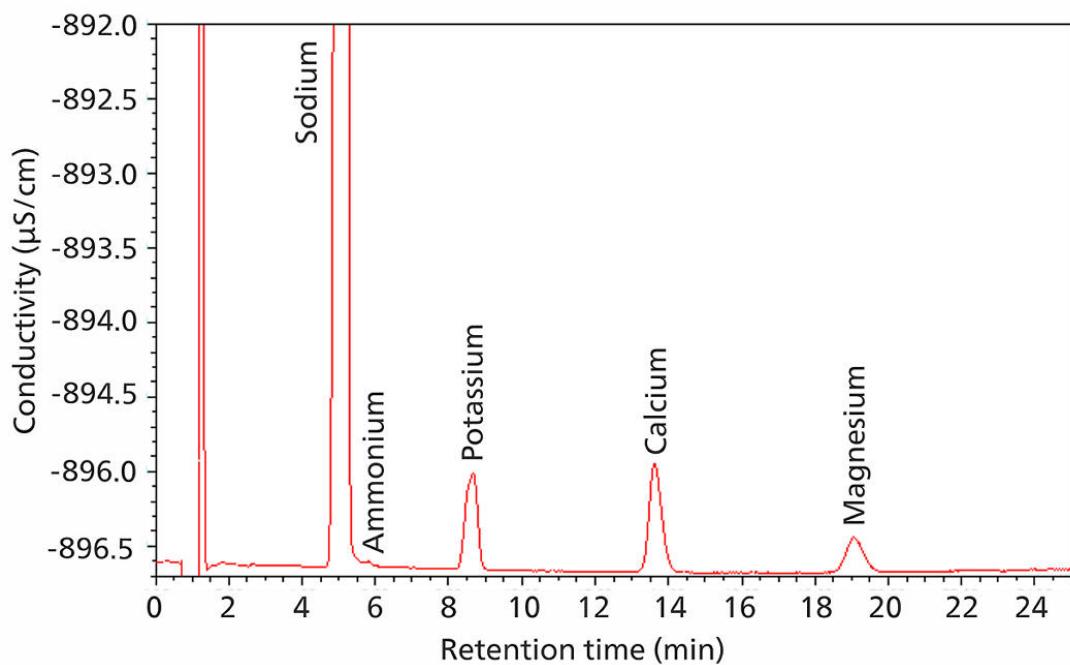


Figure 2 B.

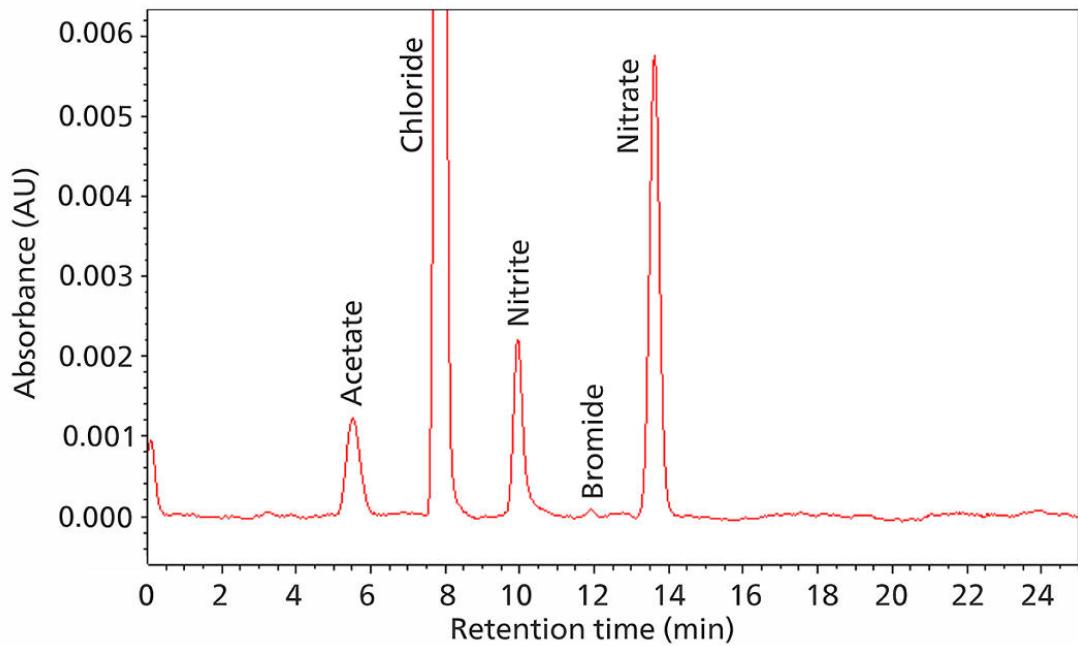


Figure 2 C. Cromatogrammi che mostrano i segnali di conducibilità (A, B) e UV (C) per l'analisi IC di anioni (incluso acetato) e cationi nel campione di concentrato per emodialisi n. 293. Tutti i campioni sono stati diluiti di un fattore 750 con UPW. Il volume di iniezione era di 20 μL .

Per i concentrati A, la determinazione accurata di tutti i componenti (acetato, cloruro, sodio, potassio, calcio e magnesio, Tabella 1) è indispensabile e richiede un'adeguata separazione dei picchi combinata con picchi acuti e simmetrici. L'uso delle colonne Metrosep A Supp 19 e Metrosep C 6 previene i suddetti problemi: le elevate capacità delle colonne prevengono il sovraccarico della matrice e garantiscono un'eccellente separazione dei picchi.

Tabella 2. Dati per i componenti principali nei campioni di concentrato A per emodialisi n. 293 e n. 570 da MTN Neubrandenburg GmbH una società Nipro. I dati mostrano valori medi e RSD per due campioni preparati e analizzati separatamente (diluizione 1:500), nonché i recuperi basati sui dati del produttore.

	# 293 Concentrazione _{AVG} ±SD (RSD (%))	Recupero (%)	#570 Concentrazione _{AVG} ±SD (RSD (%))	Recupero (%)
Sodio (mol/l)	3,70±0,04 (1,0)	103	4,90±0,03 (0,6)	106
Potassio (mmol/L)	66,21±0,52 (0,8)	95	86,75±0,42 (0,5)	96
Magnesio (mmol/L)	15,95±0,11 (0,7)	91	21,47±0,08 (0,4)	96
Calcio (mmol/L)	50,36±0,56 (1,1)	96	55,18±0,19 (0,3)	98
Cloruro (mol/L)	3,84±0,01 (0,2)	103	4,97±0,01 (0,1)	104
Acido acetico (mol/L)	0,11±<0,01 (<0,1)	102	0,14±<0,01 (0,2)	102

L'acetato (\approx 8 g/L) può essere determinato direttamente accanto a concentrazioni di cloruri elevate (\approx 180 g/L) sulla colonna Metrosep A Supp 19. Non sono richiesti passaggi aggiuntivi, come l'eliminazione della matrice o l'utilizzo di diversi fattori di diluizione. I cationi possono essere determinati in parallelo dallo stesso campione (Figura 1, canale

cationico) poiché la colonna Metrosep C 6 è ideale anche per campioni ad alta matrice.

Per analizzare le potenziali impurità nitrito, bromuro e nitrato, è possibile ottenere una maggiore sensibilità utilizzando un rivelatore UV/VIS a una lunghezza d'onda di 205 nm.

CONCLUSIONE

I concentrati per dialisi utilizzati per i trattamenti di emodialisi sono soluzioni altamente saline, che richiedono analisi di controllo della qualità tolleranti alla matrice, accurate e sensibili. Utilizzando un sistema IC a doppio canale, anioni e cationi possono essere determinati in modo accurato e simultaneo dallo stesso campione. In meno di 25 minuti è possibile quantificare i principali componenti concentrati di acetato, cloruro, sodio, potassio, calcio e magnesio, insieme alle impurità (p. es., nitrito, nitrato o ammonio). Sebbene l'analisi di matrici ad alta salinità sia spesso difficile, le colonne di separazione ad alta capacità Metrosep A Supp 19 e Metrosep C 6 riducono i rischi comuni di sovraccarico

della colonna e identificazione e quantificazione dei picchi imprecisi. L'analisi simultanea dei componenti anionici e cationici e delle impurità consente un esame completo di tutti gli analiti da un singolo campione, presentando l'IC come una tecnica analitica accurata, sensibile, efficiente e ad alto rendimento per il controllo di qualità di soluzioni farmaceutiche come i concentrati per emodialisi. I sistemi Metrohm IC possono essere completamente controllati (comprese le funzioni intelligenti e automatizzate) da diversi software: MagIC Net (Metrohm), EmpowerTM 3 (Waters) o OpenLab CDS (Agilent). Queste opzioni forniscono una soluzione flessibile per molti laboratori analitici.

RIFERIMENTI

- [1] Hoenich, N.; Thijssen, S.; Kitzler, T.; Levin, R.; Ronco, C. Impatto della qualità dell'acqua e della composizione del fluido di dialisi sulla pratica della dialisi. *BU 2008*, 26 (1), 6–11. <https://doi.org/10.1159/000110556>.
- [2] Hoenich, N. UN.; Ronco, C. Liquido per emodialisi: composizione e importanza clinica. *BU 2007*, 25 (1), 62–68. <https://doi.org/10.1159/000096400>.
- [3] Coulliette, A. D.; Arduino, M. J. Emodialisi e qualità dell'acqua. *Seminari in Dialisi 2013*, 26 (4), 427–438. <https://doi.org/10.1111/sdi.12113>.
- [4] Parker, J. N.; Parker, P. M. *Emodialisi: un dizionario medico, una bibliografia e una guida di ricerca annotata sui riferimenti Internet*; Pubblicazioni ICON sulla salute, USA, 2004.
- [5] Catto, G. R. D. *Emodialisi*; Editori accademici Kluwer, Dordrecht, Boston, Londra, 1989.

Internal reference: AW IC CH-1455-042022

CONTACT

Metrohm Italiana Srl
Via G. Di Vittorio, 5
21040 Origgio (VA)

info@metrohm.it

CONFIGURAZIONE



Metrosep A Supp 19 - 150/4,0

Proprietà di separazione eccezionali ed elevata capacità: queste le caratteristiche che fanno risaltare la famiglia di prodotti Metrosep A Supp 19 rispetto al portfolio di colonne. Questa famiglia di prodotti si contraddistingue per le migliori simmetrie dei picchi e selettività, nonché per l'elevata stabilità termica, meccanica e chimica che la rende estremamente robusta e stabile a portate e pressioni più elevate.

La variante da 150 mm rappresenta la colonna standard per la cromatografia anionica, dal momento che riesce a risolvere in sicurezza la maggior parte delle applicazioni ed è molto versatile. Data la sua elevata capacità, la colonna di separazione Metrosep A Supp 19 - 150/4,0 è particolarmente adatta anche alle applicazioni complesse con matrici impegnative. Viste le sue eccezionali proprietà di separazione, la colonna Metrosep A Supp 19 - 150/4,0 è utilizzabile in una gamma molto ampia di applicazioni, tra cui:

- Determinazione di anioni standard (fluoruro, cloruro, nitrito, bromuro, nitrato, fosfato e solfato) nei più svariati campioni d'acqua;
- Determinazione di anioni standard e acidi organici con matrici di campione complesse, come ad es. campioni ambientali e alimentari;
- Determinazione di anioni standard e acidi organici nell'acqua di alimentazione delle caldaie, per garantire il funzionamento sicuro delle centrali elettriche;
- Determinazione di anioni standard nei campioni farmaceutici.



Metrosep A Supp 19 Guard/4,0

La Metrosep A Supp 19 Guard/4,0 protegge in modo affidabile le colonne di separazione anionica della famiglia di prodotti Metrosep A Supp 19 da contaminanti presenti nel campione o nell'eluente, prolungandone quindi notevolmente la vita utile. Le precolonne e le colonne di separazione della famiglia di prodotti Metrosep A Supp 19 sono realizzate in PEEK e riempite con lo stesso materiale. Così facendo si garantisce che le prestazioni di separazione cromatografiche non siano in alcun modo compromesse.

Il sistema «On Column Guard System» permette di avvitare direttamente e facilmente la precolonna sulla colonna di separazione anionica. Il prezzo accessibile e la facilità d'uso rendono la Metrosep A Supp 19 Guard/4,0 la protezione ideale per la colonna di separazione.



Metrosep C 6 - 150/4,0

Le matériau haute capacité de la C 6 fait de la colonne de séparation Metrosep C 6 - 150/4,0 la solution optimale pour la séparation des cations standard à des concentrations très différentes avec des temps de rétention raisonnables. Les eaux potables présentant de faibles teneurs en ammonium peuvent être déterminées à l'aide de cette colonne.



Metrosep C 6 Guard/4,0

La Metrosep C 6 Guard/4,0 contiene il materiale della colonna C 6 e serve come protezione da particelle e impurità. In tal modo viene prolungata notevolmente la durata della colonna di separazione analitica. La Metrosep C 6 Guard/4,0 funziona secondo il «On Column Guard System» e viene montata sulla rispettiva colonna di separazione pressoché senza volume morto.



940 Professional IC Vario TWO/SeS/PP

Il 940 Professional IC Vario ONE/SeS/PP è l'intelligente strumento IC a **due canali** con **soppressione sequenziale** (un canale) e una **pompa peristaltica** per la rigenerazione del soppressore. Lo strumento può essere impiegato con qualsiasi metodo di separazione e di rilevamento.

Campi d'impiego tipici:

- Strumento standard per determinazioni parallele di anioni e cationi
- Analisi delle tracce per anioni e cationi
- Monitoraggio in linea per anioni e cationi



889 IC Sample Center – cool

L'889 IC Sample Center – cool è la soluzione di automazione idonea quando disponete solo di una quantità molto ridotta di campione. Rispetto all'889 IC Sample Center dispone inoltre di una funzione di raffreddamento e pertanto è il campionatore ideale per campioni rilevanti dal punto di vista biochimico o per campioni termicamente instabili.



947 Professional UV/VIS Detector Vario MW

Il rilevatore intelligente di lunghezze d'onda multiple 947 Professional UV/VIS Detector Vario MW consente di quantificare in modo sicuro e affidabile le sostanze attive nel campo ultravioletto o visibile. È possibile selezionare liberamente fino a otto lunghezze d'onda. La rilevazione avviene tramite un array di diodi.