

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

HPLC STANOVENÍ NORADRENALINU V INFUZNÍCH ROZTOCÍCH

IVANA BRABCOVÁ, DALIBOR ŠATÍNSKÝ
a PETR SOLICH

*Katedra analytické chemie, Univerzita Karlova v Praze,
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Heyrovského
1203, 500 05 Hradec Králové
satinsky@faf.cuni.cz*

Došlo 15.3.10, přepracováno 9.11.10, přijato 25.11.10.

Klíčová slova: HPLC, iontově výměnná chromatografie, noradrenalin, léčiva

Úvod

Noradrenalin se používá v profylaxi nebo terapii akutní hypotenze, při terapii šokových stavů nereagujících na doplnění objemu tekutinami, při infarktu myokardu, traumatu, sepsi, selhání ledvin, srdečních operacích, chronické srdeční dekompenzaci, intoxikaci léky anebo při anafylaktické reakci. Podává se výhradně v nitrožilní infuzi, kdy se ředí 5% glukosou, event. 5% glukosou ve fyziologickém roztoku (kde glukosa zabraňuje oxidaci, která by snížila účinnost přípravku). Na českém trhu léčivých přípravků je noradrenalin dostupný pouze jako injekční roztok určený výhradně pro nitrožilní infuze.

K analýze léčiv jsou dnes široce využívány metody separační, které umožňují analýzu směsí s možností jak kvalitativního, tak kvantitativního hodnocení separovaných složek ve směsi. Pro stanovení účinných látek v léčivých přípravcích je vhodnou analytickou metodou vysokoúčinná kapalinová chromatografie – HPLC, která umožňuje provést identifikaci, kontrolu čistoty a stanovení obsahu několika látek během jedné analýzy. Další výhodou této metody je vysoká rychlost měření, citlivost stanovení (v závislosti na použité detekci), selektivita, možnost automatizace a spotřeba minimálního množství vzorku. Pro analýzu noradrenalinu ve farmaceutických přípravcích, pro monitorování jeho hladin v tělních tekutinách či jiných maticích byly v minulosti použity různé instrumentální metody od UV/Vis spektrofotometrie^{1,2}, přes jednoduchou průtokovou injekční analýzu (FIA)^{3,4}, sekvenční injekční analýzu (SIA)⁵, elektrochemické stanovení⁶, až po vysoce sofistikované metody kapilární elektroforézy⁷ a zejména HPLC^{8–11}.

HPLC analýza může být provedena ve dvou různých modech, a to na reverzních fázích^{8,9} anebo pomocí iontově párové chromatografie^{10,11}.

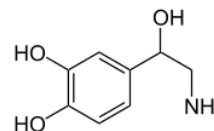
Vzhledem k chemické struktuře noradrenalinu (obr. 1) je použití HPLC se systémem reverzních fází nevhodné. Důvodem je vysoce hydrofilní struktura molekuly noradrenalinu ($\log P_{\text{exp}} -1,39$)¹², jeho vysoká rozpustnost ve vodě (340 g l^{-1} , cit.¹²), a zejména jeho acidobazické vlastnosti ($\text{pK}_a 8,58$, cit.¹²), které způsobují téměř nulovou retenci na reverzní stacionární fázi. Extrémně nízkou retenci noradrenalinu na reverzní fázi umocňuje navíc ionizace skupiny $-\text{NH}_2$ při běžných pracovních pH silikagelových chromatografických kolon ($\text{pH } 2\text{--}8$). Tyto teoretické aspekty chování noradrenalinu v systému reverzních fází potvrdily i naše předběžné pokusy o stanovení noradrenalinu pomocí C-18 kolon od různých výrobců. Cílem předložené práce bylo tedy navrhnout optimální chromatografické podmínky pro stanovení noradrenalinu s důrazem na robustnost, přesnost, správnost a spolehlivost vyvinuté metody. Jako vhodná metoda byla vybrána HPLC s iontově výměnnou stacionární fází $-\text{SO}_3\text{H}$, u níž byl předpoklad dostatečné retence molekuly noradrenalinu na základě elektrostatických sil, což bylo potvrzeno při optimalizaci vyvíjené metody. Vyvinutá a validovaná metoda byla následně použita ke stanovení noradrenalinu v injekčních roztocích určených pro nitrožilní infuze.

Experimentální část

Chemikálie

Chemikálie použité pro přípravu roztoků standardů: methanol, (Sigma-Aldrich, Německo); noradrenalin, (Aldrich Chem., Německo); paracetamol (Anqiu Pharmaceutical, Čína); glukosa (Sigma-Aldrich, Německo).

Pro přípravu mobilní fáze byly použity následující chemikálie: ultračistá voda, Milli-Q (Millipore, Bedford, USA); triethylamin 99%, (Sigma-Aldrich, Německo);



Obr. 1. Strukturální vzorec noradrenalinu

kyselina fosforečná 85%, (Merck, Darmstadt, Německo). Pro testování obsahu noradrenalinu ve farmaceutickém přípravku byly použity 1 ml ampulky infuzního roztoku Norepinephrini tartras, (Zentiva, Česká republika).

Přístroje

Analýzy byly provedeny na HPLC LC-20AD Shimadzu Prominence s DAD detektorem. Byla použita UV detekce při vlnové délce 210 nm.

Chromatografické podmínky

Analýza byla provedena izokratickou elucí na koloně Supelcosil™ LC-SCX 25 cm × 3 mm, velikost částic 5 μm. Použitou mobilní fází byla 0,085% kyselina fosforečná a 1% triethylamin (90:10; v/v) při průtokové rychlosti mobilní fáze 1,5 ml min⁻¹ a teplotě 40 °C, dávkované množství vzorku bylo 10 μl. Byla použita UV detekce při 210 nm. Vhodná vlnová délka detekce byla stanovena na základě proměření spektra noradrenalinu a vnitřního standardu paracetamolu pomocí DAD detektoru.

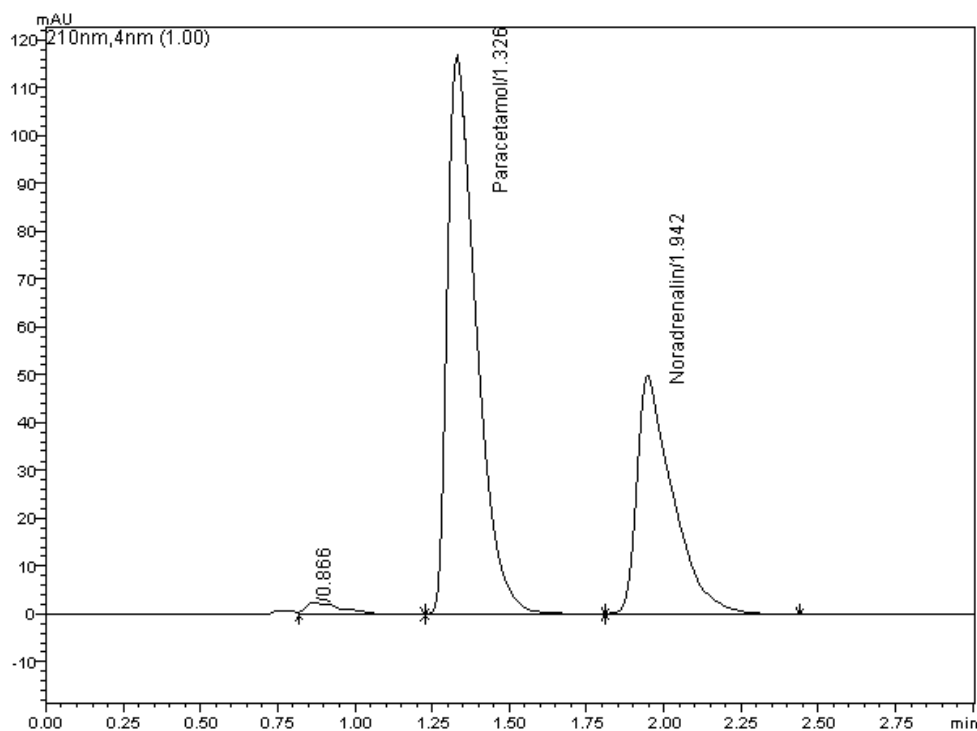
Příprava vzorků

Obsah noradrenalinu byl testován ve farmaceutickém přípravku 1 ml ampulky určené pro infuzní roztoky. Vzorky byly připraveny z injekčních ampulek odebráním 500 μl roztoku přípravku a jeho naředěním do 10ml odměrné baňky roztokem 1% glukosy, která zabraňuje oxidaci noradrenalinu. Před doplněním roztoku vzorku po rysku byl do každého vzorku napipetován vnitřní standard paracetamolu o koncentraci 50 mg ml⁻¹. Stejným způsobem byl připraven i porovnávací roztok standardů.

Výsledky a diskuse

Vývoj metody

Ve většině případů stanovení léčiv pomocí HPLC figurují v Českém lékopise kolony obsahující C-18 reverzní fáze. Pro stanovení čistoty noradrenalinu podle Českého lékopisu je uváděna metoda TLC se silikagelovou stacionární fází¹³. Jak již bylo zmíněno v úvodu, při pokusech o HPLC stanovení noradrenalinu na C-18 reverzních stacionárních fázích nebylo dosaženo uspokojivých výsledků (nedostatečná retence na různých kolonách). Při testování



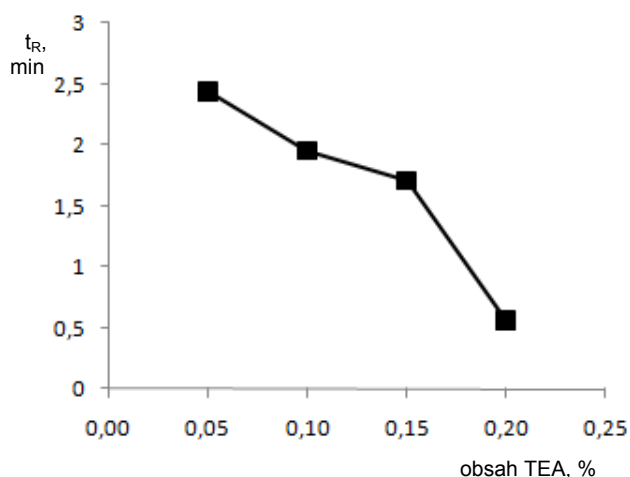
Obr. 2. Chromatogram stanovení noradrenalinu a vnitřního standardu paracetamolu v infuzním roztoku Norepinephrini tartras při použití validovaných chromatografických podmínek. Kolona Supelcosil™ LC-SCX 25 cm × 3 mm, velikost částic 5 μm, mobilní fáze 0,085% kyselina fosforečná a 1% triethylamin (90:10; v/v), průtoková rychlost mobilní fáze 1,5 ml min⁻¹, teplota 40 °C, nástřik vzorku 10 μl, koncentrace noradrenalinu 80 mg l⁻¹, UV detekce 210 nm

Tabulka I
Parametry chromatografického stanovení noradrenalinu

Parametr	Noradrenalin	Paracetamol
Retenční čas, min	1,862	1,342
Rozlišení píků		2,393
Symetrie píků	1,774	1,963
Počet teoretických pater	1539	938

vlivu různých pH, při použití mobilních fází s téměř 100% obsahem vodné složky, nebyly prakticky v žádném případě nalezeny podmínky pro retenci noradrenalinu na koloně a vždy docházelo k úplné, nebo částečné koeluci píku analytu s mrtvým objemem kolony. Z výše uvedených důvodů byla změněna stacionární fáze a byla testována iontově výměnná fáze (SCX) s $-\text{SO}_3\text{H}$ skupinou, která je pro využití v analýze léčiv netypická. Díky elektrostatickým interakcím mezi funkční skupinou $-\text{NH}_2$ noradrenalinu a $-\text{SO}_3\text{H}$ stacionární fáze během chromatografického procesu docházelo k silné retenci noradrenalinu na koloně. Jako mobilní fáze byla zvolena 0,085% kyselina fosforečná s přidavkem triethylaminu, jehož procentuální obsah byl dále optimalizován. Vliv obsahu triethylaminu v mobilní fázi na retenci noradrenalinu na iontově výměnné stacionární fázi je znázorněn na obr. 3.

Finální optimální chromatografické podmínky, které zajišťovaly dostatečnou retenci látky na koloně a zbytečně neprodlužovaly stanovení noradrenalinu, byly následující: mobilní fáze 0,085% kyselina fosforečná a 1% triethylamin (90:10; v/v), průtoková rychlost $1,5 \text{ ml min}^{-1}$, teplota 40°C , dávkované množství vzorku $10 \mu\text{l}$, UV detekce při 210 nm. Analýza probíhala na chromatografické koloně SupelcosilTM LC-SCX, $25 \text{ cm} \times 3 \text{ mm}$, velikost částic $5 \mu\text{m}$.



Obr. 3. Závislost retenčního času noradrenalinu na iontově výměnné stacionární fázi na obsahu triethylaminu v mobilní fázi

Výběr vnitřního standardu

Pro výběr vhodného vnitřního standardu bylo testováno celkem třináct látek. Pouze jedna vyhovovala požadavkům na rychlost analýzy a na separaci od píku noradrenalinu. Vnitřním standardem byl proto zvolen paracetamol s retenčním časem 1,34 min (retenční čas noradrenalinu 1,86 min). Pík paracetamolu je dobře separován od píku mrtvého objemu kolony a vlastní analyzované látky a dále jeho retenční čas neprodlužuje analýzu.

Validace metody

Všechny výsledky byly získány metodou s použitím vnitřního standardu na základě poměru ploch píku stanovené látky a vnitřního standardu.

Linearita

Kalibrační křivka byla připravena na šesti koncentračních hladinách 40, 60, 80, 100, 120 a 140 mg l^{-1} roztoků pracovních standardů noradrenalinu, do kterých byl přidán vnitřní standard paracetamol. Plochy píků pro každou koncentraci jsou průměrem tří měření a pro další výpočty byl brán průměr z těchto tří hodnot. Kalibrační křivka pro noradrenalin je lineární v koncentračním rozmezí 40 až 140 mg l^{-1} a lineární regresí byl pro ni vypočten vztah $y = 9976x + 11705$ (korelační koeficient $r = 0,9999$). Rovnice kalibrační přímky pro paracetamol: $y = 19159x + 22286$ (korelační koeficient $r = 0,9998$).

Opakovatelnost

Byla dávkována šestkrát po sobě směs látek o koncentraci 40, 60, 80, 100, 120 a 140 mg l^{-1} . Z odezvy signálu píků byla vypočítána relativní směrodatná odchylka (RSD), která nepřesáhla hodnotu 0,12 %.

Správnost

Správnost byla ověřena na šesti vzorcích, do kterých byl přidán standard noradrenalinu o koncentraci $79,94 \text{ mg l}^{-1}$ a byla vyjádřena jako výtěžnost R (%). Výtěžnost byla zjišťována na jedné (střední) koncentrační hladině a pohybovala se v rozmezí 101,8–103,7 %.

Tabulka II

Experimentální data získaná při validaci metody

Parametr	Noradrenalin	Paracetamol
Rozsah kalibrační křivky, mg l ⁻¹	40,0–139,9	39,9–139,6
Korelační koeficient	0,9999	0,9998
Opakovatelnost (RSD), %	0,12	–
Výtěžnost, %	101,8–103,7	–
Limit kvantifikace, mg l ⁻¹	0,14	–

Limit kvantifikace

Limit kvantifikace (LOQ) pro stanovení noradrenalinu byl určen jako desetinásobek poměru odezvy plochy píku vůči šumu nulové linie. V případě nástřiku 10 µl objemu vzorku byla hodnota limitu kvantifikace pro noradrenalin vypočítána jako koncentrace 0,14 mg l⁻¹.

Robustnost

Robustnost metody byla testována pro injekční roztok s přidavkem vnitřního standardu paracetamolu. Sledován byl vliv složení mobilní fáze 0,085% kyselina fosforečná a 1% triethylamin při poměrech: (95/5; v/v) a (85/15; v/v) na separaci a plochy píků obou látek. Složení mobilní fáze nemělo vliv na retenční čas paracetamolu, který byl v obou případech 1,33 min.

V případě noradrenalinu se retenční čas pohyboval v rozmezí 1,59–2,27 min. Se zvýšením obsahu triethylaminu v mobilní fázi docházelo ke zrychlení analýzy, avšak obě látky zůstávaly dostatečně separované s rozlišením větším než 1,5.

Sledován byl vliv změny složení mobilní fáze na plochy píků, změny se pohybovaly v rozmezí 100,5–101,8 % pro noradrenalin a v rozmezí 99,7–101,4 % pro paracetamol.

Dále byl sledován vliv teploty v rozmezí 30–50 °C, změny ploch píků noradrenalinu a paracetamolu se pohybovaly v desetinách procent. Změny v retenčních časech se pohybovaly v rozmezí 1,78–1,87 min pro noradrenalin, pro paracetamol 1,25–1,40 min.

Výsledky ukazují pouze malou změnu retenčních časů a ploch píků (hodnota plochy píků za optimálních a validovaných podmínek je brána jako 100 %) a tím prokazují vysokou robustnost prezentované metody.

Stabilita standardního roztoku

Stabilita roztoku standardu noradrenalinu byla testována při snížené teplotě 4 °C a nepřístupu světla a dále za laboratorní teploty do 72 h od jeho přípravy. Sledován byl vliv času na plochu píku noradrenalinu, změny se pohybovaly v rozmezí 0,1–0,9 %. Roztok noradrenalinu je tedy za testovaných podmínek stabilní a je možné jej používat

při uchování za snížené nebo laboratorní teploty minimálně do 72 h od jeho přípravy.

Závěr

Popsaná metoda umožňuje stanovení noradrenalinu v injekčních roztocích. Byly navrženy a validovány optimální chromatografické podmínky stanovení noradrenalinu s důrazem na robustnost, přesnost, správnost a spolehlivost vyvinuté metody. Dále byly testovány validační parametry metody; byla ověřena linearita, přesnost, správnost, robustnost a selektivita metody pro testované léčivo. Vyvinutá a validovaná metoda byla následně použita ke stanovení noradrenalinu v injekčních roztocích určených pro nitrožilní infuze. I přesto, že k separaci byla použita chromatografická kolona o celkové délce 25 cm, je analýza časově nenáročná a doba jedné analýzy je menší než 2,5 minuty. Vyvinutá metoda navíc využívá principů tzv. „zelené chromatografie“ a pracuje s netoxickou mobilní fází, která obsahuje minimální množství organických činidel. Společně s jednoduchou úpravou vzorku byla vyvinuta metoda ekologicky a ekonomicky šetrná, kterou je možné použít v rutinní laboratorní praxi při lékopisných a kontrolních stanoveních.

Autoři děkují za finanční podporu práce Výzkumnému záměru MSM 0021620822 a Grantovému projektu Univerzity Karlovy SVV 2011-263 002.

LITERATURA

1. Sorouraddin M. H., Manzoori J. L., Kargarzadeh E., Haji Shabani A. M.: J. Pharm. Biomed. Anal. 18, 877 (1998).
2. Sorouraddin M. H., Manzoori J. L., Dameshghi M., Haji Shabani A. M.: J. Pharm. Biomed. Anal. 18, 883 (1998).
3. Zhang L., Teshima N., Hasebe T., Kurihara M., Kawashima T.: Talanta 50, 677 (1999).
4. Seckin Z. E., Volkan M.: Anal. Chim. Acta 547, 104 (2005).
5. Amorim C. G., Araujo A. N., Montenegro M. C. B. S. M.: Talanta 72, 1255 (2007).
6. Wang Q., Nanqiang L.: Talanta 55, 1219 (2001).

7. Shouljian W., Guanqun S., Jin-Ming L.: *J. Chromatogr., A* 1098, 166 (2005).
8. Sanchez A., Toledo-Pinto E. A., Menezes M. L., Pereira O. C. M.: *Pharmacol. Res.* 50, 481 (2004).
9. Anne T. Wood, Michael R. Hall.: *J. Chromatogr., B* 744, 221 (2000).
10. Chan E. C. Y., Wee P. Y., Ho P. C.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22, 515 (2000).
11. Neubecker T. A., Coombs M. A., Quijano M., O'Neill T. P., Cruze C. A., Dobson R. L. M.: *J. Chromatogr. B*, 718, 225 (1998).
12. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00368>; staženo 12/2009
13. *Český lékopis 2009*, s. 2772. Grada Publishing, Praha 2009.

I. Brabcová, D. Šatínský, and P. Solich
(*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové*): **HPLC Determination of Norepinephrine in Pharmaceuticals**

The aim of the work was to develop a new chromatographic method for the determination of norepinephrine in intravenous infusions. The new method is based on separation of norepinephrine and the internal standard paracetamol on a strongly acid cation exchanger. The validation parameters of the method were satisfactory. The method is applicable for the above purpose in routine analysis.