

Metoda HPLC pentru determinarea simultana a oxitocinei și clorbutanolului din solutii injectabile

HPLC method for simultaneous determination of oxytocin and clorobutanol in injectable solutions

Ana Csuma, Despina Niță, Ana Cișmileanu și Luciana Paraschiv
S.N. Institutul Pasteur S.A.

Cuvinte cheie: *Oxitocina, clorbutanol, soluții injectabile, metoda HPLC-UV.*

Key words: *Oxytocin, clorobutanol, injectable solutions, HPLC-UV method.*

Rezumat

Obiectivul lucrării a fost stabilirea și validarea unei metode HPLC cu detecție în ultraviolet (UV) pentru determinarea simultană a oxitocinei și clorbutanolului din produse medicinale veterinare injectabile. Metoda se bazează pe prescripțiile din monografia pentru soluție concentrată de oxitocină din Farmacopeia Europeană. Separarea cromatografică s-a făcut pe o coloană Syn Chropack RP100 C18 (250 x 4,6mm, 5 μm) cu fază mobilă compusă din soluție A: tampon fosfat acid de sodiu 0,13 M și soluție B: acetonitril-apă (1:1, v/v) cu gradient de eluție (30 % B pentru 1 min, 30 % la 60 % B în 30 min, revenire la concentrația inițială și echilibrare 15 min înainte de înjecția următoare), la un debit de 1 ml/min și detecție la 220 nm. Timpul de retenție pentru oxitocină și clorbutanol au fost de circa 15 min și respectiv 26 min. Producții de degradare al oxitocinei au eluat la timpi de retenție mai mici de 14 min. Rezoluția dintre oxitocină și cel mai apropiat pic s-a încadrat în cerințele Farmacopoeii de minim 1,5. S-a evaluat linearitatea metodei între 2,5 UI/ml – 20 UI/ml oxitocină și 1,25 mg/ml – 10 mg/ml clorbutanol. În aceste domenii metoda s-a dovedit lineară pentru ambii componenți, coeficienții de corelație ai curbelor de calibrare fiind mai mari de 0,9950. Metoda a fost validată în termeni de selectivitate, linearitate, exactitate și fidelitate.

Abstract

The objective of this work was to establish and validate a HPLC method with UV detection for simultaneous determination of oxytocin and clorobutanol in veterinary injectable formulations. The method is based on European Pharmacopoeia monograph for oxytocin concentrated solution. Chromatographic separation was achieved on a Syn Chropack RP100 C18 column (250 x 4,6mm, 5 μm) with a mobile phase consisting of solution A: sodium dihydrogen phosphate buffer 0,13 M and solution B: acetonitrile-water (1:1, v/v) with gradient elution (30 % B for 1 min, 30 % B to 60 % B in 30 min, return to initial concentration and equilibration for 15 min before the following injection), at a flowrate of 1 ml/min and detection at 220 nm. The retention times for oxytocin and clorobutanol were about 15 min and 26 min respectively. The degradation products of oxytocin eluted at retention times smaller than 14 min. The resolution between oxytocin and the nearest impurity fulfilled the USP monograph requirements of at least 1,5. The linearity of the method has been settled from 2,5 UI/ml to 20 UI/ml for oxytocin and 1,25 mg/ml to 10 mg/ml for clorobutanol. In these ranges the correlation coefficients were higher than 0,9950. The method allows the separation of oxytocin from degradation products and clorobutanol and could be applicable to quality control of injectable products containing oxytocin and clorobutanol. The method was validated in terms of selectivity, linearity, precision and accuracy.

Introducere

Oxitocina este o nanopeptidă obținută prin sinteză cu structură similară hormonului produs de lobul posterior al glandei pituitare. Este utilizată în medicina veterinară, sub

formă de soluții injectabile, în principal, ca stimulent asupra uterului și favorizant al ejeției lactante. În general soluțiile injectabile sunt formulate pentru a conține 5 UI/ml până la 10 UI/ml oxitocină și 5 mg/ml clorbutanol cu rol de conservant.

Metodele HPLC cu detecție UV și detecție fluorescentă după derivatizare s-au dovedit selective și sensibile pentru determinarea oxitocinei.

Separări corespunzătoare ale oxitocinei de alte polipeptide s-au obținut pe coloane cu fază inversă de diverse dimensiuni și mărimi ale particulelor, în regim izocrat sau cu gradient, folosind în general ca fază mobilă tampon fosfat/acetonitril și detecție la 210-220 nm.

Clorbutanolul este unul din agenții antimicrobieni aprobat pentru utilizare în produse farmaceutice.

Cerința Farmacopoei este de a declara conținutul de agent antimicrobian și de a demonstra că acesta este prezent în cantitatea declarată în limite de $\pm 20\%$.

Majoritatea metodelor publicate pentru determinarea clorbutanolului sunt metode GC. Metodele HPLC constituie o alternativă și s-au dovedit lineare și selective.

Scopul lucrării este stabilirea și validarea unei metode HPLC de determinare simultană a oxitocinei și clorbutanolului din soluții injectabile, aptă pentru controlul de rutină al preparatelor veterinare.

Material și metodă

Standarde și reactivi

S-a folosit oxitocină Ph.Eur. (PN 70002) conținând oxitocină acetat cu o activitate de 524 UI/mg, clorbutanol de la Sigma, acetonitril HPLC gradient grade de la Merck, fosfat acid de sodiu p.a. de la Merck.

Apa ultrapură (rezistivitate $\leq 18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) s-a obținut cu sistemul Ultra Clear TWF (SG GmbH, Germania).

Soluții standard

S-a preparat separat soluție etalon stoc de oxitocină (circa 100 UI/ml) în tampon fosfat acid de sodiu 0,13 M și soluție etalon stoc de clorbutanol (12,5 mg/ml) în acetonitril/apă (1:1, v/v). S-a cântărit cca 10 mg oxitocină substanță de referință, cu exactitate de 0,1 mg, în balon cotat de 50 ml

s-a dizolvat și s-a adus la volum cu tampon fosfat acid de sodiu S-a calculat concentrația exactă de oxitocină, în UI/ml, ținând cont de conținutul declarat de oxitocină al substanței de referință.

S-au cântărit 625 mg clorbutanol substanță de referință, cu exactitate de 0,1 mg, în balon cotat de 50 ml, s-a dizolvat în acetonitril-apă (1:1, v/v) prin sonicare, s-a diluat la volum și s-a omogenizat.

S-au preparat soluții etalon mixte de calibrare prin pipetare în baloane cotate de 10 ml de cote părți de 0,25 ml, 0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml și respectiv 2 ml soluție etalon stoc de oxitocină și 1,0 ml, 2,0 ml, 4,0 ml, 6,0 ml și respectiv 8,0 ml de soluție etalon stoc de clorbutanol și completare la semn cu tampon fosfat acid de sodiu.

S-a calculat conținutul exact de oxitocină în UI/ml și clorbutanol în mg/ml. Concentrațiile de oxitocină și clorbutanol din soluțiile de calibrare au corespuns cu circa 25 % până la 200 % din concentrația declarată în produsul comercial.

Analiza HPLC

Analiza HPLC s-a efectuat pe un cromatograf de lichide de înaltă performanță Waters 2695, echipat cu sistem automat de injecție, termostat cu temperatura controlată, sistem de pompe cu gradient ternar, degazor de solvenți, autosampler, detector PDA (Waters 2998).

Separarea cromatografică s-a făcut pe o coloana analitică Syn Chropack RP100 C18 (250mm x 4,6mm, 5 μm), menținută la 30 °C.

Faza mobilă a constat din fosfat acid de sodiu 0,13 M (solvent A) – acetonitril/apă (1:1, v/v) (solvent B) cu următorul gradient de concentrație: 30 % B pentru 1 min, 30 % – 60 % B în 30 min, revenire la concentrația inițială și echilibrare 15 min înainte de injecția următoare, la un debit de 1 ml/min. Volumul de injecție a fost de 25 μl .

Detecția s-a făcut la 220 nm. Evaluarea ariilor, analiza de regresie a curbei etalon și calculul concentrațiilor s-a făcut cu programul Waters - Empower.

Rezultate și discuții

Separarea

În prima fază s-au optimizat condițiile de lucru în termeni de coloană analitică, pH-ul fazei mobile, debitul fazei mobile, pentru a obține o formă a picurilor și o separare corespunzătoare între oxitocină, produșii de degradare ai oxitocinei și clorbutanol.

S-a încercat separarea pe mai multe coloane cu fază inversă.

O rezoluție bună și o formă simetrică a picurilor celor doi compuși principali,

oxitocina și clorbutanol, s-a obținut pe coloana Syn Chropack RP100 C18 (250 x 4,6mm, 5 μm), la un pH al fazei mobile A de 3,0 și un debit de 1 ml/min. În condițiile alese s-a obținut un timp de retenție pentru oxitocină de 15,4 min și pentru clorbutanol de 26,2 min.

O cromatogramă tipică este dată în figura 1. Această coloană asigură o rezoluție de 3,1 între picul de oxitocină și cel mai apropiat pic (figura 3), mai mare decât cerința din monografia USP de min 1,5.

Rezoluția dintre oxitocină și clorbutanol este semnificativă ($R = 7,1$).

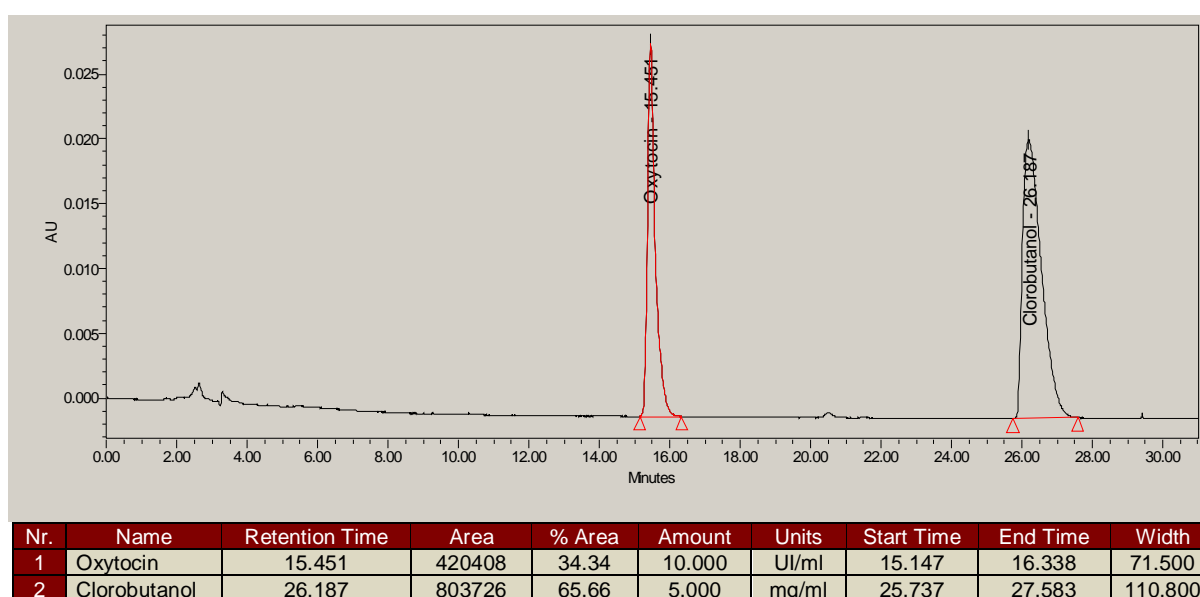


Figure 1 - Cromatograma unei soluții etalon conținând 10 UI/ml oxitocină și 5 mg/ml clorbutanol

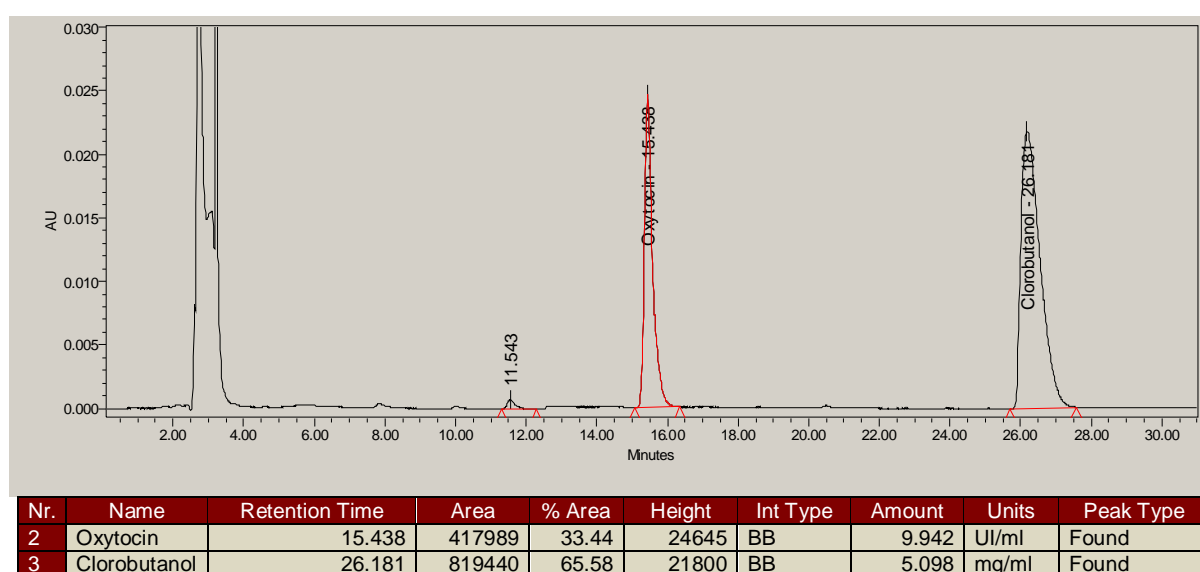


Figure 2 - Cromatograma unui produs comercial de oxitocină soluție injectabilă

În figura 2 se dă cromatograma unui produs comercial formulat pentru a conține 10 UI/ml oxitocină și 5 mg/ml clorbutanol.

Validarea metodei

Metoda s-a validat pentru următorii parametri: selectivitate, linearitate și domeniu de linearitate, exactitate și fidelitate.

Selectivitate

Selectivitatea metodei s-a demonstrat pentru interferențe cu alți excipienți prezenți în produsul formulat. S-au analizat probe

martor ale matricei (toate componentele produsului comercial mai puțin substanța activă (oxitocină) și conservantul (clorbutanol) și nu s-au observat interferențe la timpul de retenție al oxitocinei (cca. 15 min) și al clorbutanolului (cca 26 min).

De asemenea s-a supus un produs comercial la condiții de stres prin expunere la radiații UV. Producții de degradare rezultate (6,25 min și 13,12 min) nu au interferat cu picul de oxitocină și clorbutanol (figura 3).

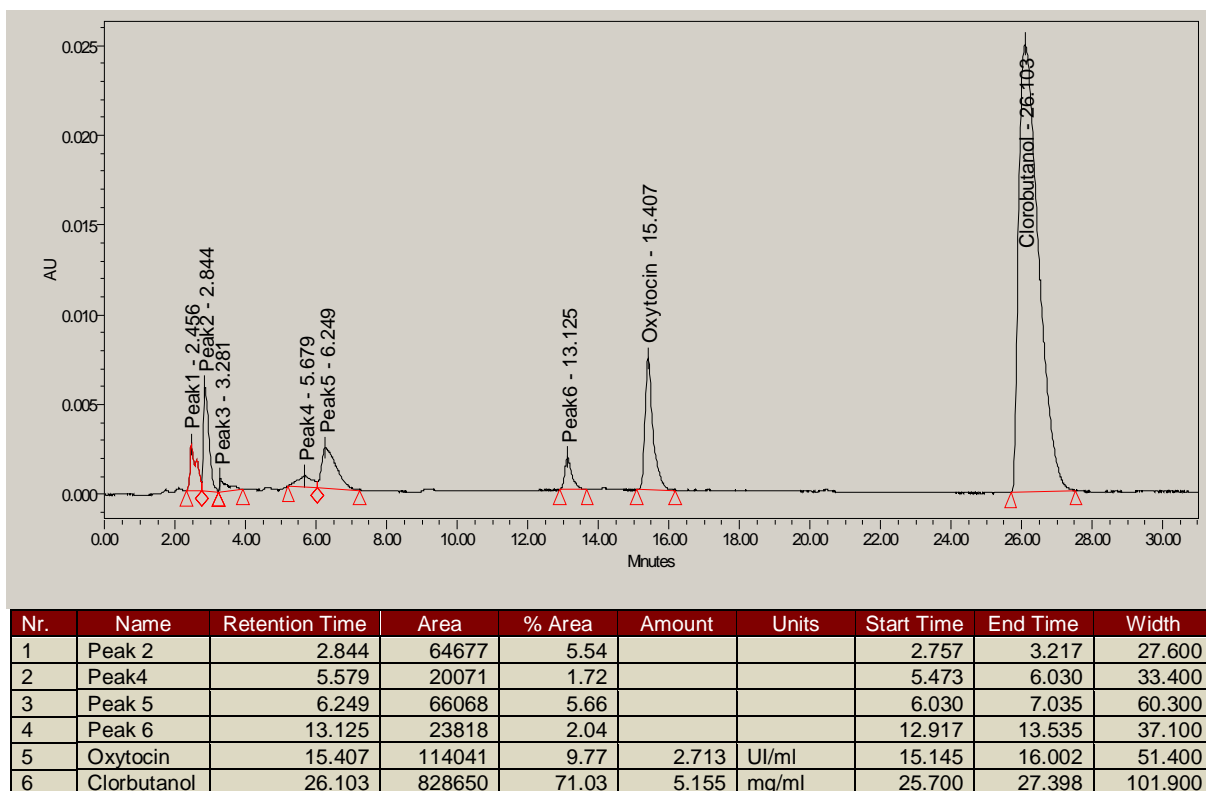


Figura 3 - Cromatograma unui produs supus degradării

Linearitate și domeniu de linearitate

Linearitatea metodei s-a evaluat prin analiza a 5 concentrații diferite de soluții etalon reprezentând 25 % până la 200 % din valorile predictibile ale produselor injectabile pe bază de oxitocină.

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1.

Coeficienții de corelare (R^2) ai curbelor de calibrare (figura 4 și 5) sunt mai mari de 0,9950, ceea ce denotă o linearitate corespunzătoare pentru domeniile alese (Miller & Miller, 1993).

Tabelul 1
Linearitate și domeniu de linearitate

| Component | Domeniu | Ecuția de regresie lineară | Coeficient de regresie lineară (r^2) |
|-------------|-----------------------|-------------------------------|------------------------------------------|
| Oxitocină | 2,5 UI/ml – 20 UI/ml | $y = 4.53e+004 x + 1.03e+004$ | 0.999676 |
| Clorbutanol | 1,25 mg/ml – 10 mg/ml | $y = 1.79e+005 x - 1.93e+004$ | 0.999982 |

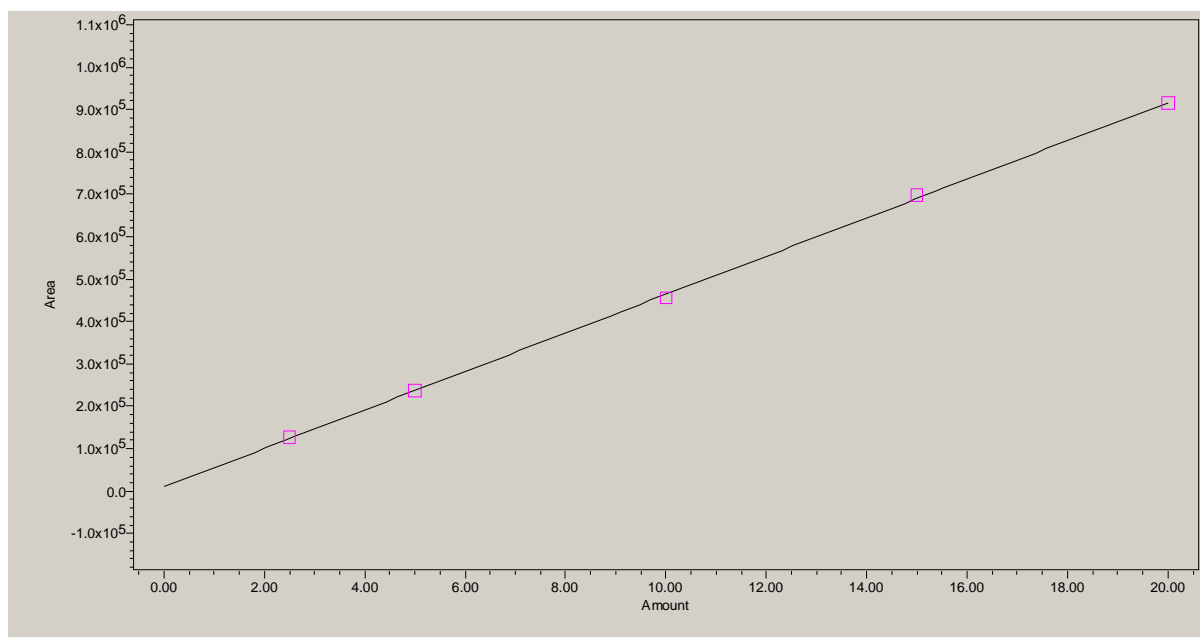


Figura 4. Curba de calibrare pentru oxitocină între 2,5 UI/ml – 20 UI/ml

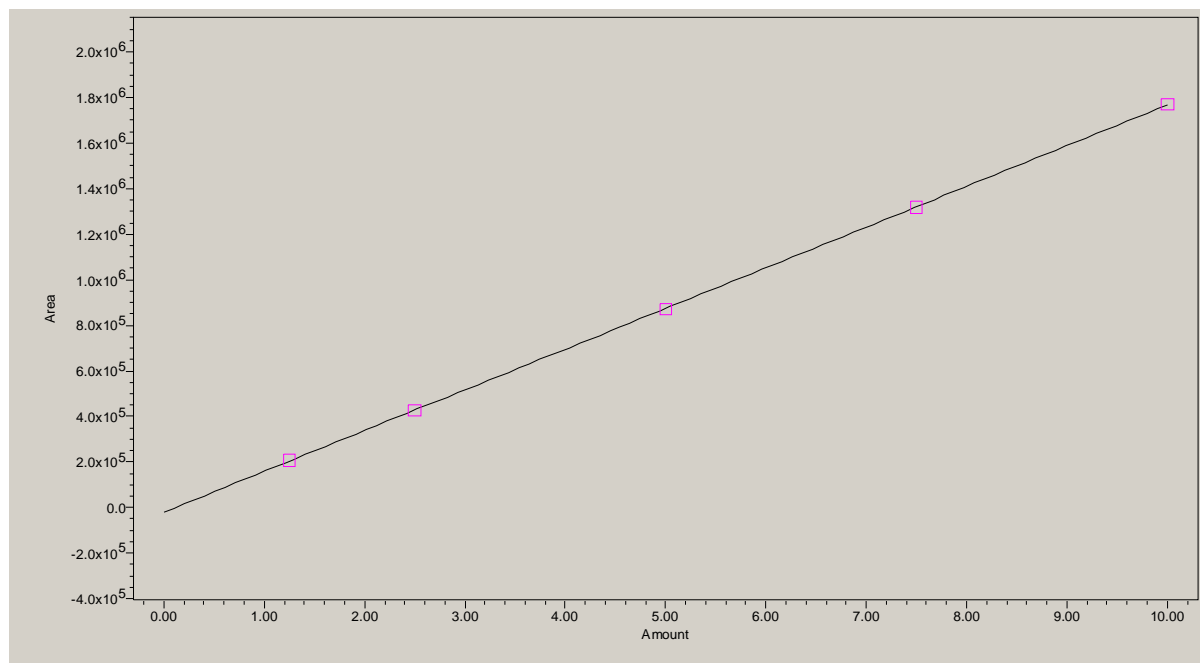


Figura 5. Curbe de calibrare pentru clorbutanol în domeniul 1,25 mg/ml – 10 mg/ml

Exactitate și fidelitate

Exactitatea metodei s-a evaluat prin analizarea a 6 probe diferite în aceeași zi și în zile diferite.

Abateră standard relativă a repetabilității (RSD_r) și a reproductibilității intermediare (RSD_R) au fost sub 2,0 % (tabelul 2 și 3).

Fidelitatea metodei s-a stabilit prin experimente de recuperare. Pentru aceasta la proba martor (soluție placebo conținând

0,4 g clorură de sodiu și 0,035 g acid acetic la 100 ml apă) s-au adăugat cantități cunoscute de oxitocină și clorbutanol pentru a obține concentrații în domeniul 25%-200% din concentrația teoretică a produselor injectabile comerciale.

S-au calculat recuperările care s-au situat între 98,3%-102,6% pentru oxitocină și 97,2%-102,1% pentru clorbutanol cu RDS_R mai mici de 2,0 % (tabelul 4)

Tabelul 2
Rezultatele testului de repetabilitate

| Componenți | Proba | | | | | | Media | S _r | RDS _r % |
|--------------------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|----------------|-----------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | | | |
| Oxitocină, UI/ml | 9,89 | 10,25 | 10,12 | 9,98 | 10,07 | 10,15 | 10,08 | 0,127 | 1,27 |
| Clorbutanol, mg/ml | 4,88 | 5,08 | 5,06 | 4,95 | 4,92 | 5,01 | 4,98 | 0,08 | 1,60 |

Tabelul 3
Rezultatele testului de reproductibilitate intermediară

| Componenți | Ziua 1 | Ziua 2 | Ziua 3 | Ziua 4 | Ziua 5 | Ziua 6 | Media | S _R | RDS _R % |
|--------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|----------------|-----------------------|
| Oxitocină, UI/ml | 10,25 | 10,11 | 9,86 | 10,05 | 10,24 | 9,91 | 10,07 | 0,46 | 1,62 |
| Clorbutanol, mg/ml | 5,08 | 4,98 | 5,14 | 5,12 | 5,03 | 4,88 | 5,04 | 0,10 | 1,93 |

Tabelul 4
Recuperările pentru diferite nivele de fortificate ale probei martor

| Componenți | Nivel de fortificare (% din valoarea teoretică a produsului) | | | | | Recuperarea medie % | S _R | RDS _R % |
|--------------------|--------------------------------------------------------------|------|-------|-------|-------|---------------------|----------------|-----------------------|
| | 25 % | 50 % | 100 % | 150 % | 200 % | | | |
| Oxitocină, UI/ml | 102,6 | 99,8 | 98,3 | 101,5 | 98,8 | 100,2 | 1,82 | 1,81 |
| Clorbutanol, mg/ml | 102,1 | 99,8 | 100,3 | 98,2 | 97,2 | 99,8 | 2,00 | 2,00 |

Concluzii

Metoda de analiză a oxitocinei și clorbutanolului prin tehnica HPLC a permis o separare corectă a oxitocinei de clorbutanol și de substanțele de degradare ale oxitocinei.

Metoda a prezentat selectivitate și față de celelalte ingrediente ale formulării.

Metoda permite determinarea simultană a oxitocinei și clorbutanolului printr-o singură injecție în HPLC.

Metoda s-a dovedit lineară atât pentru oxitocină cât și pentru clorbutanol, permițând determinarea cu precizie a ambilor componenți.

Metoda nu este afectată de variații mici ale debitului, temperaturii coloanei și pH-ului fazei apoase și poate fi folosită pentru controlul calității produselor injectabile pe bază de oxitocină.

Acetate by HPLC with UV Detection using the Acclaim Mixed-Mode WAX-1 column, 2009.

4. Wang G, Miller RB, Melendez L, Iacobus R (1997). A stability-indicating HPLC method for the determination of oxytocin acetate in oxytocin injection, USP, synthetic, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 20: 567-581.
5. Suresh K, Kavitha MP, Dharuman J, Dhandapani B (2010). RP-HPLC method development and validation for the estimation of oxytocin in milk, *International Journal of ChemTech Research*, 2,(2): 1340-1343.
6. Sudhakar Ryali, Varaprasad Bobbarala (2011). Development and validation of a stability-indicating analytical method for the quantitation of oxytocin, *International Journal of Chemical and Analytical Science*, 2(10): 1222-1225.

Bibliografie

1. The European Pharmacopoeia 7.0 (2008), Monograph of oxytocin concentrated solution 01/2008:0779.
2. US Pharmacopoeia 31, (2008). Oxytocin monograph.
3. DIONEX Application Note 234. Simultaneous Determination of Pharmaceutical Peptides and