

Validarea unei metode de cromatografie lichidă de înaltă performanță pentru determinarea vitaminei A, vitaminei D₃, vitaminei E și alcoolului benzilic într-o soluție injectabilă uleioasă de uz veterinar

Validation of a High-Performance Liquid Chromatography method for the determination of vitamin A, vitamin D₃, vitamin E and benzyl alcohol in a veterinary oily injectable solution

Maria Neagu, Georgiana Soceanu, Ana Caterina Bucur

Departamentul de Dezvoltare și Cercetare, SC Pasteur Filipești,
Calea Giulești, nr. 333, sector 6, București, Romania

Corespondenta: maria.neagu@pasteur.ro

Cuvinte cheie: *vitamina A, vitamina D₃, vitamina E, validare, HPLC*

Key words: *vitamin A, vitamin D₃, vitamin E, validation, HPLC*

Rezumat

A fost realizată și validată o metodă de cromatografie lichidă de înaltă performanță simplă, rapidă și precisă pentru determinarea vitaminei A, vitaminei D₃, vitaminei E și alcoolului benzilic într-o soluție injectabilă uleioasă. Metoda poate fi utilizată pentru detectarea și cuantificarea impurităților cunoscute și necunoscute și degradate în substanțe medicamentoase în timpul analizei de rutină cât și pentru studiile de stabilitate în ceea ce privește capacitatea de separare a produșilor de degradare. Metoda a fost validată pentru acuratețe, precizie, specificitate, robustețe și limite de cuantificare conform Ghidurilor ICH. Evaluarea vitaminei A, vitaminei D₃, vitaminei E și alcoolului benzilic s-a realizat prin sistemul de purificare a apei HPLC prin utilizarea sistemului de pompare a gradientului. Condițiile cromatografice cuprind o coloană C18 cu fază inversă (dimensiunea particulelor de 5 μm, 250 mm×4.6 mm i.d.) cu o fază mobilă constând din tetrahidrofuran acetonitril și apă în eluție de gradient. Debitul a fost de 0,8 ml/min și 2,0 ml/min. Curbele standard au fost liniare depășind intervalul de concentrație de 16,50 μg/ml până la 11 mg/ml pentru vitamina A, 10,05 μg/ml la 6,70 mg/ml pentru vitamina E, 0,075 μg/ml la 0,050 mg/ml pentru vitamina D₃ și 1,25 mg/ml la 5,00 mg/ml pentru alcoolul benzilic. Analizele statistice au arătat că metoda a fost precisă, reproductibilă, selectivă, specifică și exactă pentru analiza vitaminei A, vitaminei D₃, vitaminei E, alcoolului benzilic și impurităților.

Abstract

A new simple, rapid, accurate and precise high – performance liquid chromatography (HPLC) method for determination of vitamin A, vitamin D₃, vitamin E and benzyl alcohol in oily injectable solution was developed and validated. The method can be used for the detection and quantification of known and unknown impurities and degradants in the drug substance during routine analysis and also for stability studies in view of its capability to separate degradation products. The method was validated for accuracy, precision, specificity, robustness and quantification limits according to ICH Guidelines. The estimation of vitamin A, vitamin D₃, vitamin E and benzyl alcohol was done by Waters HPLC system manager using gradient pump system. The chromatographic conditions comprised a reverse-phased C18 column (5 μm particle size, 250 mm×4.6 mm i.d.) with a mobile phase consisting of tetrahydrofurane, acetonitrile and water in gradient elution. The flow rate was 0.8 ml/min and 2.0 ml/min. Standard curves were linear over the concentration range of 16.50 μg/ml to 11.00 mg/ml for vitamin A, 10.05 μg/ml to 6.70 mg/ml for vitamin E, 0.075 μg/ml to 0.050 mg/ml for vitamin D₃ and 1.25 mg/ml to 5.00 mg/ml for benzyl alcohol. Statistical analyses proved the method was precise, reproducible, selective, specific and accurate for analysis of vitamin A, vitamin D₃, vitamin E, benzyl alcohol and impurities.

1. Introducere

Vitaminele sunt micronutrienți esențiali necesari organismului în cantități mici cu roluri specifice în menținerea funcționării normale la nivel celular, în creștere și dezvoltare. Vitaminele utilizate în metodă (vitamina A, vitamina D₃ și vitamina E) sunt vitamine liposolubile, ceea ce înseamnă că sunt reținute în țesutul adipos după ce organismul își utilizează necesarul.

Aceasta poate duce la o acumulare a vitaminelor liposolubile în organism dacă se realizează un aport medicamentos crescut. Vitaminele liposolubile reținute în organism duc la hipervitaminoză, o afecțiune cu potențial periculos. Acest lucru nu se întâmplă și în cazul vitaminelor hidrosolubile, excesul fiind eliminat rapid prin urină.

Analiza cantitativă a compoziției multivitaminelor rămâne o provocare pentru chimiștii analitici. Una dintre dificultățile de bază este legată de natura înalt reactivă a vitaminelor și izolarea cantitativă a fiecărei componente [1].

Procedura analitică de evaluare a vitaminelor este foarte laborioasă și de durată [2-6].

S-a estimat o durată de câteva luni pentru determinarea lipo/hidro solubilității vitaminelor prin metoda cromatografică [7,8].

Nu se cunoaște o metodă de HPLC care să permită separarea, testarea și determinarea purității vitaminelor A, D₃, E și alcoolului benzilic dintr-o soluție injectabilă uleioasă pe determinare cromatografică.

Există probleme în realizarea metodei de separare a alcoolului benzilic din fenol și timpul îndelungat de eluție pentru vitamin A.

Vitamina A este separată în mod uzual pe coloană cromatografică cu fază normală, deoarece este liposolubilă, dar prin utilizarea tetrahidrofuranului în compoziția fazei mobile, separarea fiind posibilă pe coloană cu fază inversă.

Fenolul și alcoolul benzilic au fost separați prin utilizarea unei faze mobile constând din apă și acetonitril (50:50) care permit o rezoluție mai mare de 1,5 între ei.

Metoda a fost validată pentru: acuratețe, precizie, specificitate, robustețe și cuantificarea limitelor conform Ghidurilor ICH [9, 10].

Scopul cercetării este de a realiza o metodă precisă, specifică și reproductibilă pentru determinarea vitaminei A, vitaminei D₃, vitaminei E și alcoolului benzilic în aceleași condiții cromatografice.

2. Materiale și Metode

2.1. Substanțe chimice și reagenți

Vitamina A a fost obținută din USP, vitamina D₃, vitamina E și alcoolul benzilic au fost obținute din EDQM. Acetonitrilul, n-hexanul și tetrahidroxifuranul, reagenți, au fost obținuți de la Merck. S-a utilizat de asemenea apa purificată.

2.2. Aparatură

Aparatura utilizată a fost Modulul de separare Waters HPLC 2695 de tip autoinjector și detectorul Waters PDA 2696. Coloana utilizată a fost Thermo BDS Hypersyl – C18, mm x 4.6 mm, dimensiune particule 5 μm.

2.3. Condiții cromatografice

Separarea cromatografică s-a realizat la 25°C pe o coloană cu fază inversă prin utilizarea unei faze mobile formată din solventul A (tetrahidroxifuran), solventul B (acetonitril) și solventul C (apa).

Eluția gradientului s-a realizat treptat de la 0 la 5 minute 50% B și 50% C; 5-15 minute 100% B, 15-28 minute 25% A și 75% B; 28-35 minute 50% B și 50% C.

Debitul a fost păstrat la 0,8 ml/min de la 0-5 minute și 28-30 minute și 2,0 ml/min de la 5-28 minute iar detecția s-a realizat la 285 nm pentru vitamina E și substanțele înrudite și 325 nm pentru vitamina A și substanțele înrudite.

Volumul de injectare a fost de 1 μl pentru standardele și probele de vitamina A și 50 μl pentru standardele și probele de vitamina E, vitamin D₃ și alcool benzilic.

2.4. Validarea Metodei

Parametrii studiați pentru validarea metodei au fost limita de detecție (LDD), limita

de cuantificare (LDC), liniaritatea, acuratețea, precizia, repetabilitatea, robustețea și specificitatea. LDC a fost definit drept concentrația minimă care poate fi determinată cu acuratețe și precizie acceptabile. LDD și LDC au fost realizate cu un răspuns de la semnal la zgomot.

Liniaritatea a fost apreciată prin curba de calibrare. Pentru realizarea curbei de calibrare, s-au preparat cinci soluții standard de calibrare iar cinci soluții standard de calibrare au fost utilizate în determinarea purității.

Precizia și repetabilitatea au fost estimate prin testarea a șase probe replică în ziua 1 și 2.

Acuratețea a fost evaluată prin aprecierea substanței recuperate.

Specificitatea s-a apreciat prin forța de degradare a probei. Probele au fost supuse degradării acide și bazice, degradării termice și cu peroxid de hidrogen.

2.5. Prepararea Soluției

Prepararea standard: O soluție standard pentru testarea vitaminei A, vitaminei E și vitaminei D₃ s-a realizat cu acuratețe prin transferul a 55,0 mg vitamina A RS, 33,5 mg vitamin E RS, 25,0 mg alcool benzilic și 1 ml vitamina D₃ soluție stoc standard hexan.

O soluție standard a fost pregătită pentru testarea purității pentru a ajunge la o concentrație finală de 55,0 ppm vitamina A, 33,5 ppm vitamina E și 0,25 ppm vitamina D₃.

Pregătirea probei: Soluția de testare s-a realizat prin transferul cu acuratețe a 1,0 ml soluție uleioasă cu ajutorul unei seringi într-un recipient gradat. A fost adusă la volum cu hexan.

Rezultate și discuții

LDD și LDC: au fost determinate Limita de detecție și Limita de cuantificare. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 1.

Tabel 1
Rezultatele LDD și LDC

Vitamina	LDD	LDC
Vitamina A	0,160 μg/ml	0,533 μg/ml
Vitamina D ₃	0,0006 μg/ml	0,0021 μg/ml
Vitamina E	0,090 μg/ml	0,301 μg/ml

Liniaritate: Metoda s-a dovedit a fi liniară pentru intervalul de concentrații descris.

Când zonele medii de vârf au fost reprezentate grafic față de nivelul de concentrație, s-au obținut coeficienți de corelație bună (r²).

Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 2.

Tabel 2
Coeficienții de corelație pentru cei doi compuși

Vitamina / componenta	Coeficienți de corelație r ²	
	Test (Probă, Analiză)	Substanțe asemănătoare
Vitamina A	0,9994	0,9993
Vitamina D ₃	0,9996	0,9994
Vitamina E	0,9995	0,9999
Alcool benzilic	0,9997	0,9998

Acuratețea: Metoda actuală este validă și exactă.

Acuratețea a fost evaluată prin determinarea recuperării. Precizia metodei a fost determinată prin amestecarea unui etalon de vitamina A, vitamina D₃, vitamina E și alcool benzilic în placebo la diferite nivele de concentrație: 80, 100 și 120% a concentrației țintă a fiecăruia dintre compușii pentru puritate și analiză.

Recuperarea absolută a fost determinată în trei exemplare prin comparația directă a zonei de vârf a standardului față de cel al probei. Datele au fost analizate statistic prin calcularea RSD.

Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 3.

Tabel 3
Rezultatele de acuratețe

Vitamina / componenta	Recuperare (%)	
	Test (Probă, Analiză)	Substanțe asemănătoare
Vitamina A	95,0-101,7	95,2-104,3
Vitamina D ₃	99,1-102,6	97,4-102,8
Vitamina E	96,3-101,5	97,6-100,6
Alcool benzilic	97,9-100,5	-

Precizia: Precizia a fost evaluată în funcție de repetabilitatea aplicării și măsurarea datelor.

Cu scopul de a evalua capacitatea metodei de a produce rezultate similare pentru teste repetitive pentru concentrații nominale, șase probe individuale de vitamina A, vitamina D₃, vitamina E și alcool benzilic au fost testate

separat. Acesta a arătat abateri standard relative mici pentru cei patru compuși. Precizia intermediară a metodei a fost efectuată în șase eșantioane diferite de un alt analist (laborant), în două zile diferite.

Valoarea RSD este sub 2% pentru cei doi compuși; precizia intermediară a metodei este stabilită. Rezultatele sunt prezentate în **Tabelul 4**.

Tabelul 4

Rezultatele de precizie

Vitamina / componenta	Repetabilitate % RSD	Precizia intermediară % RSD
Vitamina A	1,6	0,2
Vitamina D ₃	1,4	0,4
Vitamina E	0,7	0,8
Alcool benzilic	1,1	0,9

Specificitate: Specificitatea metodei a fost stabilită prin analiza probelor îmbogățite / contaminate în condiții de stres.

Specificitatea a fost investigată pentru a demonstra că nu există nicio interferență între excipienți, ingredientii activi și compuși de degradare care pot fi prezenți în probe.

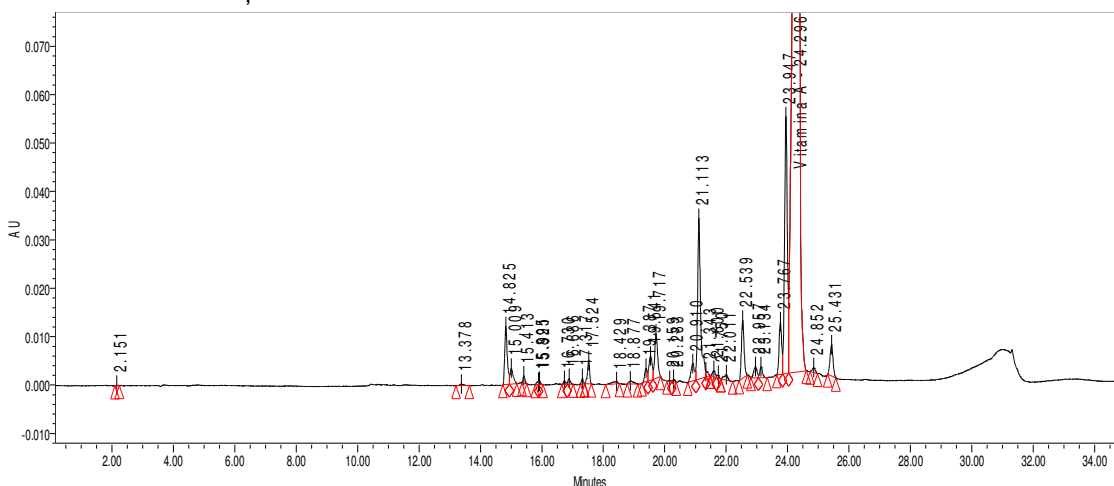
Probele în condiții de stres sunt evaluate în raport cu proba de control cu privire la testare și degradare (%).

Prezența altor ingrediente din formulări nu a cauzat nicio interferență cu vitamina A, vitamina D₃ și vitamina E.

Robustețea: Robustețea metodei a fost determinată prin analiza aceluiași standard în condiții normale de funcționare și, de asemenea, prin schimbarea unor condiții analitice cum ar fi lungimea de undă de detecție, compoziția fazei mobile și debitul.

Rezultatele obținute au arătat că metoda este robustă.

Rezultatele sunt prezentate în **Tabelul 5**.

**Fig. 1** Cromatograma probei expuse la acid**Tabelul 5**

Parametrii de robustețe și rezoluție

Parametrii	Variația	Rezoluție	
		Între alcool benzilic și fenol	Între vitamina D ₃ + provitamina D ₃ și vitamina E
Solvent apos în compoziția fazei mobile a eluției izocratice	+10% (55 : 45)	2,6	1,7
	-10% (45: 55)	1,7	1,9
Debitul metodei HPLC	+0,2 ml/min (1.0 ml/min)	2,1	1,9
	-0,2 ml/min (0.6 ml/min)	2,1	1,8
Schimbarea lungimii de undă	+ 2 nm (267 nm)	1,7	2,1
	- 2 nm (263 nm)	1,7	2,1

Concluzii

Scopul acestui studiu a fost acela de a dezvolta o metodă HPLC selectivă și sensibilă pentru detectarea rapidă a vitaminei A,

vitaminei D₃, vitaminei E și alcoolului benzilic în aceleași condiții cromatografice. Metoda propusă s-a dovedit a fi rapidă, precisă, repetabilă, specifică și robustă. Această metodă a fost aplicată pentru analiza

produsului medicamentos în formulări comerciale și ar putea fi utilizată pentru analiza de rutină a produsului medicamentos.

Bibliografie:

1. **G Klasczow G, Anuszevska EL** (2000). Simultaneous Determination of Vitamins A, D₃ and E in Multiple Pharmaceutical Products, *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, 57(3): 167-170.
2. **Genestar C, Grases F** (1995). Determination of Vitamin A in Pharmaceutical Preparations by High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection, *Chromatographia*, 40(3):143-146.
3. **Rachieru D, Duca R, Olteanu M.** (2003). Validation of a method to determine vitamin E (alpha-tocopherol) from feed ingredients by HPLC using reversed phased chromatography, *Universitatea de Stiinte Agricole si Medicina Veterinara Iasi Lucrari Stiintifice*, 52: 543-547
4. **Al-Qadi E, Battah A, Hadidi K.** (2010). Development of High-Performance Liquid Chromatographic Method for Vitamin D₃ Analysis in Pharmaceutical Preparation, *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(2): 78-86.
5. **Sarioglu S, Celebi SS, Mutlu M.** (1997). A rapid method for determination of vitamins D2 and D3 in pharmaceutical preparations by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 1997; 24(7): 973-982.
6. **Wielinski S, Olszanowski A.** (1999). Simultaneous determination of retinol acetate, retinol palmitate, cholecalciferol, α -tocopherol acetate and alphacalcidol in capsules by non-aqueous reversed phase HPLC and column back flushing. *Chromatographia*, 50(1/2): 109-112.
7. **Buszewski B, Zbanyszek W.** (2002). Determination of different solubility vitamins in pharmaceutical preparations. I. HPLC column switching. *Journal of liquid chromatography and related technologies*, 25(8):1229-1241.
8. **Chen F, Li HB** (2001). Simultaneous determination of twelve water and fat soluble vitamins by high-performance liquid chromatography with diode array detection. *Chromatographia*, 54: 270-273
9. **ICH, Q1A** (1993). Stability Testing of New Drug Substances and Products, International Conference on Harmonization. Geneva, October
10. **ICH, Q2B** (1996). Validation of Analytical Procedure: Methodology, International Conference on Harmonization. Geneva, November