



Toepassing van Bratton-Marshall reagens voor de bepaling van nitroglycerine 10 mg/mL

R. Langen, M. Obispo, Y. Göçmen en T. Egberts.

Laboratorium Ziekenhuisapotheek
Midden-Brabant
Dr. Deelenlaan 5
5042 AD Tilburg
RLangen@zamb.tsz.nl

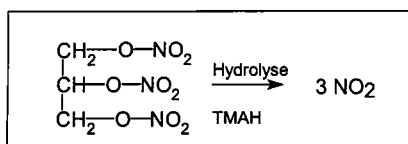
Inleiding

Nitroglycerine behoort tot de groep vasodilatantia (vaatverwijderaars) die toegepast worden bij angina pectoris (met pijn in de hartstreek, angst en beklemming gepaard gaande aanvallen, berustend op zuurstoftekort in de hartspier, meestal bij verkalking van de kransslagaderen maar ook bij zuurstoftekort in het bloed). De pijn van angina pectoris treedt op bij een verstoring van het evenwicht tussen zuurstof-vraag en zuurstof-aanbod van het hart. Bij angina pectoris wordt nitroglycerine toegepast om een acute aanval te voorkomen, te verlichten of ter vermindering van de frequentie van de aanvallen. Nitroglycerine verslapt behalve de spieren van de vaten ook die van de bronchiën, galwegen, maagdarmkanaal en urinewegen. Door deze vaatverwijding daalt de bloeddruk en vermindert de veneuze terugvloed naar het hart wat een gunstige invloed heeft op angina pectoris. [1]

In onze ziekenhuizen wordt een zeer lage concentratie nitroglycerine (10 µg/mL) gebruikt als lokale toediening in hersenbloedvaten (zeer specialistische toepassing).

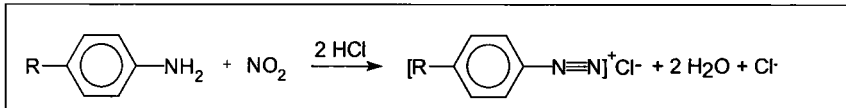
Reactievergelijking 1

De vorming van 3 mol nitriet uit 1 mol nitroglycerine.



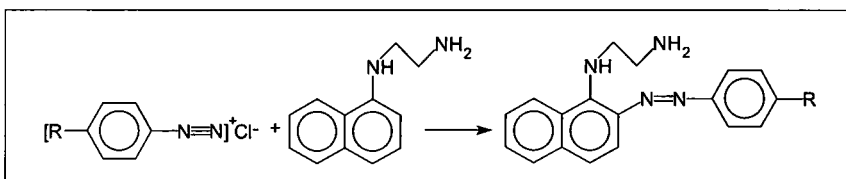
Reactievergelijking 2

De vorming van een diazoniumverbinding uit procaine en nitriet.



Reactievergelijking 3

De vorming van een paars-rood gekleurde verbinding uit de diazoniumverbinding en Bratton-Marshall reagens (naftylethyleendiamine).



Principe

Nitroglycerine wordt met behulp van tetramethylammoniumhydroxide (TMAH) gehydrolyseerd tot nitriet (zie Reactievergelijking 1). Het gevormde nitriet wordt in een verdund zuur milieu door diazotering gekoppeld aan procaine (zie Reactievergelijking 2). De ontstane diazoniumverbinding reageert met naftylethyleendiamine onder vorming van een paars-rood gekleurd product (zie Reactievergelijking 3). De toepassing van dit Bratton-Marshall reagens voor de bepaling van nitroglycerine is reeds beschreven door Bell e.a. in 1963 en 1964. [2,3,4] In de United States Pharmacopeia XIX wordt de assay beschreven onder *content uniformity* voor nitroglycerine tabletten. [5] In de recente United States Pharmacopeia 24 wordt een chromatografische methode beschreven. [6]

Materiaal en methode

De analyses zijn uitgevoerd met een Varian Cary 1E UV/VIS spectrofotometer. TMAH en n-(1)-naftylethyleendiamine 2 HCl zijn verkregen bij Sigma. Procaine HCl is verkregen bij Bufo, nitroglycerine 1% bij Merck en natriumnitriet, zoutzuur (36-38%) en

1-propanol zijn verkregen bij Baker.

Monstervoorbereiding:

Gebruik maatkolven die omwikkeld zijn met aluminiumfolie. Breng in een maatkolf van 100 mL 6,0 mL nitroglycerine (10 µg/mL) en 20,0 mL TMAH (0,25%) oplossing. Laat dit mengsel 30 minuten staan bij kamertemperatuur in een donkere ruimte. Pipetteer hierbij 5,0 mL zoutzuur 4 M en direct daarna 5,0 mL procaine HCl (15 mg/mL) oplossing. Laat dit mengsel 4 minuten in een donkere ruimte staan. Voeg 5,0 mL naftylethyleendiamine 2 HCl (0,5 mg/mL) oplossing toe, vul aan met demiwater en meet na 5 minuten de extinctie bij 550 nm in 1 cm cuvetten ten opzichte van demiwater.

Standaarden:

Gebruik maatkolven die omwikkeld zijn met aluminiumfolie. Pipetteer 5,0 mL standaard (nitriet 5-10 µg/L) in een maatkolf van 100 mL en voeg achtereenvolgens 6,0 mL ethanol, 20,0 mL TMAH (0,25%) oplossing, 5,0 mL zoutzuur 4 M en 5,0 mL procaine HCl (15 mg/mL) oplossing toe. Laat dit mengsel 4 minuten in een donkere ruimte staan. Voeg 5,0 mL

naftylethyleendiamine 2 HCl (0,5 mg/mL) oplossing toe, vul aan met demiwater en meet na 5 minuten de extinctie bij 550 nm in een 1 cm cuvet ten opzichte van demiwater. De diazoniumverbinding is extreem gevoelig voor licht. Werk zoveel mogelijk in een donkere omgeving, omwikkel de maatkolven met aluminiumfolie. Hanteer strikt de aangegeven tijden.

Berekeningen

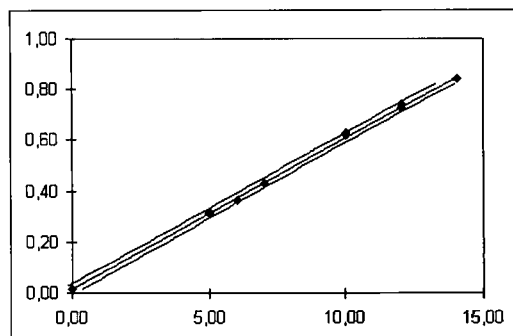
De concentratie nitroglycerine van de bereiding wordt door middel van interpolatie op de lineaire regressielijn volgens vergelijking 1 berekend. Uit de validatieparameters en literatuur blijkt het gebruik van een factor in deze berekening noodzakelijk.

Validatie

De methode is gevalideerd zoals omschreven in de op dit moment geldende regelgeving. [7]. De validatieparameters zijn gegeven in tabel I. De ijklijn waaruit de lineariteit is bepaald is gegeven in figuur 1.

Discussie en conclusie

Uit de validatieparameters blijkt dat de gevonden juistheid varieert tussen 64,1% en 65,2%. Bij een kwantitatieve omzetting zou volgens de reactievergelijking 1 mol nitroglycerine 3 mol nitriet moeten opleveren. Voor het omrekenen naar concentraties geldt dat de concentratie nitriet wordt gegeven door het product van de concentratie nitroglycerine, het aantal mol nitriet dat ontstaat en het molecuulgewicht



Figuur 1

Vergelijking 1
concentratie berekening nitroglycerine (µg/mL)

$$X = \frac{Y - A}{B} \times \frac{100}{F} \times \frac{5}{6} \times \frac{227,1}{(3 \times 46)}$$

- X = concentratie nitroglycerine (µg/mL)
Y = gemeten absorptie van het monster bij 550 nm
A = as-afsnede ijklijn
B = richtingscoëfficiënt ijklijn
F = faktor juistheid
5/6 = volume verhouding standaard en monster
227,1 = molecuulmassa nitroglycerine
46 = molecuulmassa nitriet
3 = opbrengst aantal mol nitriet uit 1 mol nitroglycerine

van nitriet gedeeld door het molecuulgewicht van nitroglycerine. Uitgaande van een concentratie van 10 µg/mL nitroglycerine zou dit $10 \times 3 \times 46 / 227,1$ is 6,1 µg/mL nitriet geven. Uit de validatiegegevens

Gegevens ijklijn

Vergelijking ijklijn:

$$y = 0,0593x + 0,0143$$

Correlatiecoëfficiënt: 0,9991
St. dev. ijklijn: 0,0089
St. dev. helling: 0,0008
St. dev. afsnijpunt: 0,0076
Fout helling: +/-0,0018
Fout afsnijpunt: +/-0,0168

blijkt dat dit niet het geval is. De gemiddeld gevonden juistheid is 64,8% - 4,0 µg/mL nitriet. In de literatuur wordt melding gemaakt van een reactierendement van 63,2%, hetgeen overeenkomt met wat wij tijdens de validatie gevonden hebben. [4] Er is geen verder onderzoek gedaan naar een verklaring voor de gevonden factor. Mogelijk dat de vorming van nitriet uit nitroglycerine niet volledig is of dat de invloed van licht op de diazoniumverbinding een nadelig effect heeft op de juistheid. De beschreven methode is snel, eenvoudig, maakt gebruik van algemeen gangbare apparatuur en is

Tabel II

x-as [nitriet] µg/mL	y-as abs. 550 nm	y-berekend	y-residu
5,020	0,3136	0,3120	0,0016
6,024	0,3644	0,3715	-0,0071
7,028	0,4261	0,4311	-0,0050
10,040	0,6299	0,6097	0,0202
12,048	0,7236	0,7288	-0,0052
14,056	0,8403	0,8478	-0,0075
5,020	0,3145	0,3120	0,0025
6,024	0,3646	0,3715	-0,0069
7,028	0,4308	0,4311	-0,0003
10,040	0,6155	0,6097	0,0058
12,048	0,7380	0,7288	0,0092
14,056	0,8405	0,8478	-0,0073

Tabel I: validatieparameters.

Parameter	Concentratie	
Lineariteit	Nitriet 1,5 – 10 µg/mL	
Detektielgrens	Nitriet 0,5 µg/mL	
Bepalingsgrens	Nitriet 1,5 µg/mL	
Herhaalbaarheid (n=6)	Nitroglycerine 10 µg/mL	4,7%
Reproduceerbaarheid (n=6)	Nitroglycerine 10 µg/mL	2,7%
Juistheid (n=6)	Nitroglycerine 10 µg/mL (= Nitriet 6,1 µg/mL)	64,1% (VC 4,7%)
Juistheid herhaling (n=10)	Nitroglycerine 10 µg/mL (= Nitriet 6,1 µg/mL)	65,2% (VC 3,0%)
Juistheid uit reproduceerbaarheid	Nitroglycerine 10 µg/mL (= Nitriet 6,1 µg/mL)	65,1% (VC 2,7%)

geschikt voor de farmaceutische kwaliteitscontrole van nitroglycerine injectievloeistof 10 µg/mL.

Literatuur

- KNMP, Informatorium Medicamentorum. 1998:857-860.
- Bell, FK. O'Neil, JJ. Burgison, RM. J.Pharm.Sci. 1963;52:637-639.
- Bell, FK. J.Pharm.Sci. 1964;53: 752-755.
- Pharmaceutisch weekblad. 1976; 3:181-188.

5. United States Pharmacopeia XIX. 1975:343-344.
6. United States Pharmacopeia 24. 2000:1189-1191.
7. FDA. Guidance for Industry; Analytical procedures and methods validation; chemistry, manufacturing and controls documentation. <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>

Anova tabel

