



Universeel HPLC-systeem voor farmaceutische analyse

Yvo de Beer

Laboratorium Klinische Farmacie & Toxicologie
Maastricht Universitair Medisch Centrum+
Postbus 5800
6202 AZ Maastricht
e-mail: yvo.de.beer@mumc.nl

Inleiding

Binnen de farmaceutische analyse wordt HPLC steeds frequenter gebruikt. Mede door het feit dat er vanuit de regelgeving gekeken moet worden naar houdbaarheid / ontleding is de vloeistofchromatografie een belangrijke analysemethode, die toegepast kan worden bij een scala aan eigenbereide producten.

De problematiek bij het gebruik van HPLC binnen de farmaceutische analyse zit hem vaak in de diversiteit aan polaire en apolaire componenten. Hierdoor zijn er vaak verschillende mobiele fasen en/of verschillende HPLC-kolommen nodig om de brede range aan producten te kunnen analyseren. Vooral (sterk)-polaire componenten zijn vaak moeilijk of niet te vertragen m.b.v. reversed-phase chromatografie. In de literatuur komt men vaak methoden tegen waarbij de te bepalen polaire component samenvalt met de dode tijd, waardoor de methode vaak niet robuust is en de verkregen resultaten dus onbetrouwbaar zijn. Enige vertraging is dus noodzakelijk om tot goede resultaten te komen.

Er zijn de laatste jaren een aantal kolommen op de markt gekomen die het mogelijk maken sterk polaire componenten en apolaire componenten van elkaar te kunnen scheiden en voldoende te vertragen, hetgeen uitkomst kan bieden binnen de farmaceutische analyse. Één van deze kolommen is de Waters Atlantis™ T3-kolom.

Atlantis T3-kolom

Waters bracht in 2006 de T3 kolom op de markt (een op silica gebaseerde C18-kolom), die niet alleen apolaire componenten kan vertragen maar door de structuur van het T3-materiaal ook retentie vertoont voor polaire componenten.

Het T3-materiaal heeft een geoptimaliseerde poriediameter, trifunctionele gebonden C18-ketens en maakt gebruik van "endcapping". Mede hierdoor kunnen polaire componenten vertraagd worden, gaat de kolom langer mee wanneer men mobiele fasen gebruikt bij lage pH en is de piekvorm bij

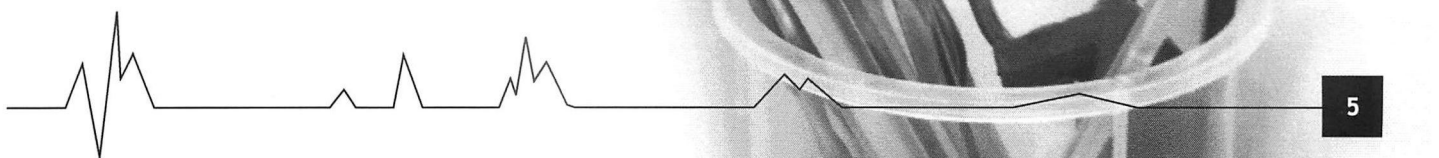
veel componenten vaak symmetrischer (vooral bij basische componenten). Tevens kunnen 100% waterige mobiele fasen gebruikt worden, hetgeen bij een silica kolom niet mogelijk is.

Opzet systeem

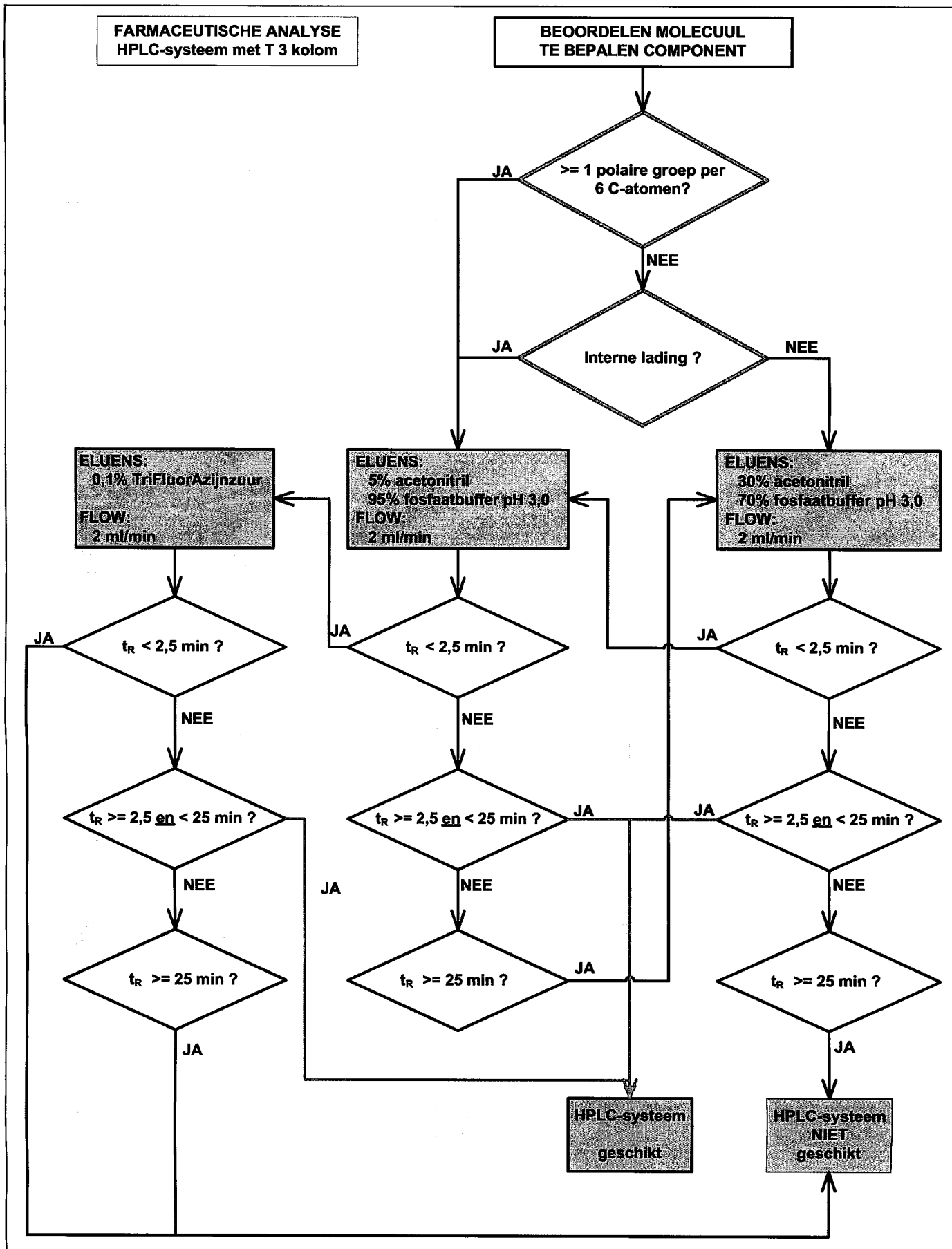
Bij de opzet van een universeel systeem voor farmaceutische analyse zijn de volgende punten van belang geweest:

- Gebruik van 1 kolomsoort (in dit geval Atlantis T3)
- Geen gradiëntstelsel
- Zo weinig mogelijk verschillende mobiele fasen
- Analysetijden korter dan 25 minuten

Door middel van het injecteren van een tiental componenten (zowel polair als apolair) in combinatie met verschillende mobiele fasen is het volgende processchema tot stand gekomen, waarbij gebruikt wordt gemaakt van nog maar 3 mobiele fasen. Zie figuur 1 op pagina 6.



Figuur 1: Processchema farmaceutische analyse



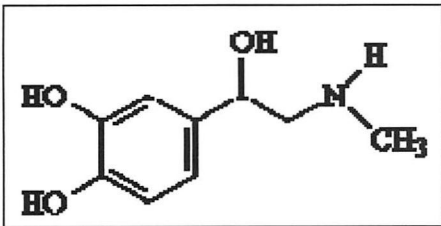
* Er is een onvolkomenheid ingesloten in nevenstaand processchema:

Wanneer een component bij 5% acetonitril een retentietijd van >25 minuten heeft en bij 30% acetonitril een retentietijd heeft van < 2,5 minuten dan komt men in een zogenaamde "loop". In dit geval is het HPLC-systeem eveneens niet geschikt.

Werkwijze/toelichting processchema

Bovenstaand processchema wordt toegelicht met epinefrine als voorbeeldcomponent.

1. Zoek de molecuulstructuur van de te bepalen component



2. Tel het aantal polaire groepen (NH, NH₂, OH, COOH).

3. Indien per 6 koolstofatomen 1 of meer polaire groepen aanwezig zijn → Start eluens: 5% acetonitril / 95% buffer pH = 3,0 (v/v). Dit eluens wordt tevens gebruikt voor moleculen met een interne lading (b.v. Cefazdim)

4. Is per 6 koolstofatomen minder dan 1 polaire groep aanwezig en er is geen interne lading aanwezig → Start eluens: 30% acetonitril / 70% buffer pH = 3,0 (v/v)

In het voorbeeld geval, zijn er 4 polaire groepen (3 x OH, 1 x NH) per 9 C-atomen. Dit is 2.7 polaire groep per 6 C-atomen. Het start-eluens is dus 5 % acetonitril / 95% buffer pH = 3,0 (v/v)

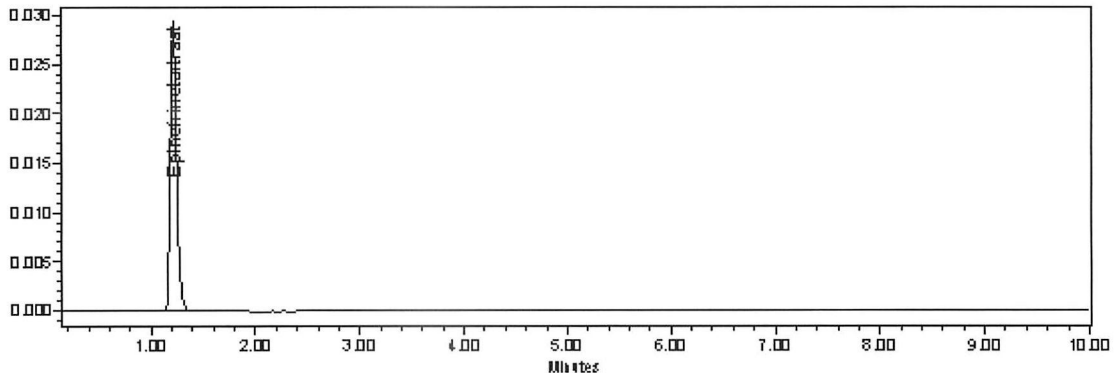
5. Maak een stockstandaard van 1000 mg/l van de te bepalen component (vrije base). Bepaal oplosmiddel a.h.v. de oplosbaarheid uit de literatuur (b.v. Clarke)

6. Verdun stockstandaard tot 10 mg/l in eluens

7. Injecteer 20 µl en volg het processchema

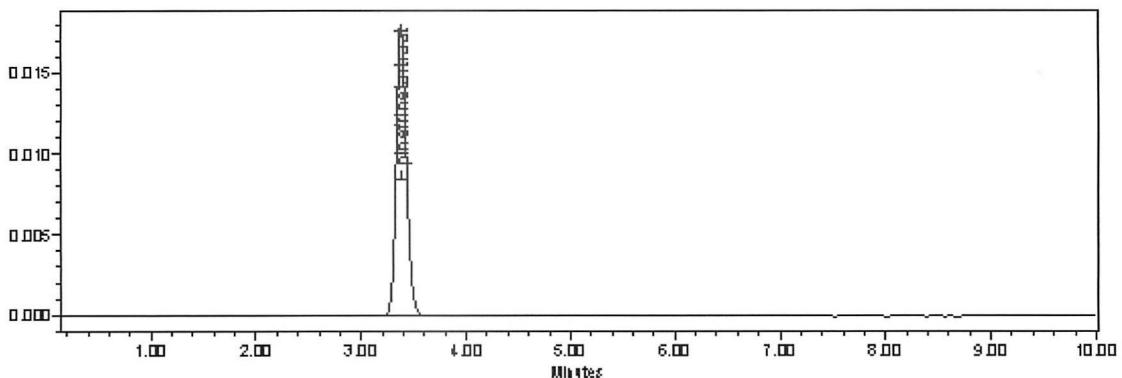
Bij epinefrine geeft dit de volgende chromatogrammen:

Chromatogram 1: Epinefrine, eluens: 5 % acetonitril / 95% buffer pH = 3,0 (v/v)

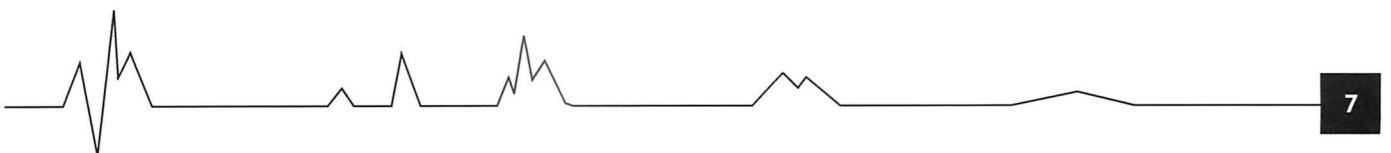


Retentietijd < 2,5 minuten, dus eluens: 0.1% TFA, zie chromatogram 2.

Chromatogram 2: Epinefrine, eluens: 0.1 % TFA



Retentietijd is 3,4 minuten. Systeem is geschikt voor analyse van epinefrine



Conclusie/evaluatie

Op het moment van schrijven is voor een 30-tal stoffen het bovenstaande processchema gevolgd. Hieruit blijkt dat 90% van deze componenten bepaald kunnen worden met de T3-kolom in combinatie met één van de drie mobiele fasen (zie tabel 1). Vooral polaire tot sterk polaire componenten zijn te vertragen met één van de drie mobiele fasen. Een vijftal eigenbereide producten (oplossingen voor injectie) zijn reeds uitgebreid gevalideerd op het T3-systeem.

Een drietal componenten (zeer apolair) hebben oneindige retentie bij 30 % acetonitril. Deze kunnen eventueel met

een mobiele fase met een hoger acetonitril-percentage binnen de 25 minuten geëluëerd worden. In een enkel geval is het niet mogelijk om de retentie tussen de 2,5 en 25 minuten te krijgen met één van de drie mobiele fasen (5 % acetonitril geeft oneindige retentie, terwijl 30 % acetonitril te weinig retentie geeft). Het is mogelijk om alle componenten te vertragen wanneer men tussenliggende verhoudingen acetonitril/fosfaatbuffer aanmaakt (indien men een HPLC-pomp heeft die 2 mobiele fasen kan mengen). Het T3-systeem kan een oplossing zijn voor laboratoria die moeite hebben een HPLC-methode op te zetten voor de analyse van polaire componenten in eigenbereide producten.

Tabel 1: Componentenlijst T3-systeem

0.1% TFA	5% ACN / 95% BUF pH=3,0	30% ACN / 70% BUF pH=3,0
Epinefrinetartraat	Paracetamol	Papaverine HCl
Phenylefrine	Baclofen	Pethidine HCl
	Hydrochloorthiazide	Dexamethason
	Theofylline	Prednisolon
	Procaine HCl	Bupivacaine
	Isoprenalinesulfaat	Adenosine
	Morfine HCl	Phenytaine-natricum
	Lidocaine HCl	Methylparabeen
	Ceftazidim	Methadon
	Scopolamine	Alimemazine
		Carbamazepine
		Cocaine HCl
		Midazolam HCl
		Diphencyprone
		Psoraleen

