

Applikation

► Schnelle Analyse von Paracetamol und seinen Prozessverunreinigungen

Kategorie	Pharmazie
Matrix	Tabletten
Methode	UHPLC
Schlagworte	Qualitätskontrolle, Analgetikum, Antipyretikum, Arzneimittel, Nebenprodukte, Acetaminophen
Analyten ID	Paracetamol VPH3, 12/08, aktualisiert 01/10



PLATIN blue

Zusammenfassung

Diese Applikation beschreibt eine Gradientenmethode zur schnellen gleichzeitigen Bestimmung von neun herstellungsbedingten Verunreinigungen sowie einem Abbauprodukt von Paracetamol unter Einsatz einer sub-2 μm Säule. Der letzte Peak eluiert nach weniger als 2 Minuten. Die hohe Geschwindigkeit und Zuverlässigkeit der Methode machen sie sehr geeignet für die Routine-Analyse in der Arzneimittel-Qualitätskontrolle.

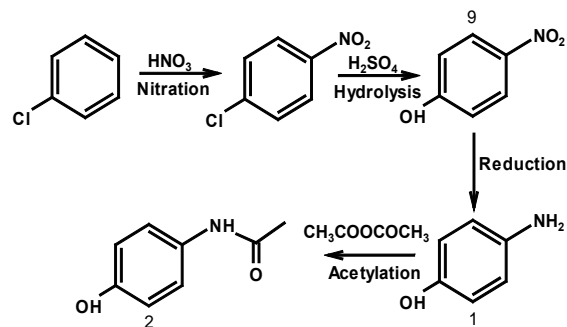
Einleitung

Paracetamol ist mit seinen schmerzlindernden und fiebersenkenden Eigenschaften ein wichtiger Wirkstoff zahlreicher Medikamente. Während seiner Synthese (Abb. 1), können 10 mögliche Nebenprodukte beobachtet werden (Abb. 2). Über die Jahre sind einige HPLC-Anwendungen entwickelt worden, um diese Verunreinigungen zu kontrollieren [1-2], inklusive einer Vorschrift der Europäischen Pharmacopeia, die eine isokratische HPLC-Methode mit einer auf Kieselgel basierenden C8-Säule mit 5 μm Partikelgröße beschreibt, die eine Laufzeit von 45 min aufweist [3]. Durch Einsatz einer optimierten Gradientenmethode kann mit einem Standard HPLC-System die Analysendauer auf 7 min verkürzt werden [4].

Um wettbewerbsfähig zu bleiben, benötigen pharmazeutische Labore sogar noch schnellere Methoden mit höherer Effektivität, Geschwindigkeit und Auflösung. Diese Prioritäten haben zur Entwicklung stabiler sub-2 μm Säulen geführt, die diese Anforderungen erfüllen. Verglichen mit 5 μm Säulen bieten sub-2 μm Säulen kürzere Analysenzeiten sowie Verbesserungen der chromatischen Auflösung, der Empfindlichkeit und Peakkapazität.

Abb. 1

Synthese von Paracetamol


Experiment
Probenvorbereitung

Paracetamol-Derivate können aus einfachen Matrices, wie Medikament-Formulierungen nach Homogenisieren leicht mit Wasser und Ultraschalleinsatz extrahiert werden. 100 mg der Gesamtprobe werden in einem 100 ml Messkolben eingewogen. Etwa 80 ml eines 50% Wasser/Methanol-Gemischs werden zugesetzt und die Probe gerührt. Nach 20 min Behandlung in einem Ultraschallbad wird die Probe abgekühlt und das Volumen mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Vor dem Injizieren wird die Probe durch ein 0,45 µm Spritzenfilter filtriert

Experiment
Vorbereitung der
Standardlösungen

Alle Lösungen der Standards wurden mit Methanol hergestellt. 0,2 g jeder zu untersuchenden Substanz wurden in 10 ml Methanol gelöst. Von der Testlösung wurde 1 ml mit mobiler Phase auf 50 ml aufgefüllt. 5 ml dieser Lösung wurden mit mobiler Phase auf 100 ml verdünnt. Die Endkonzentration jeder Verbindung betrug in der Standardlösung 0,020 mg/ml.

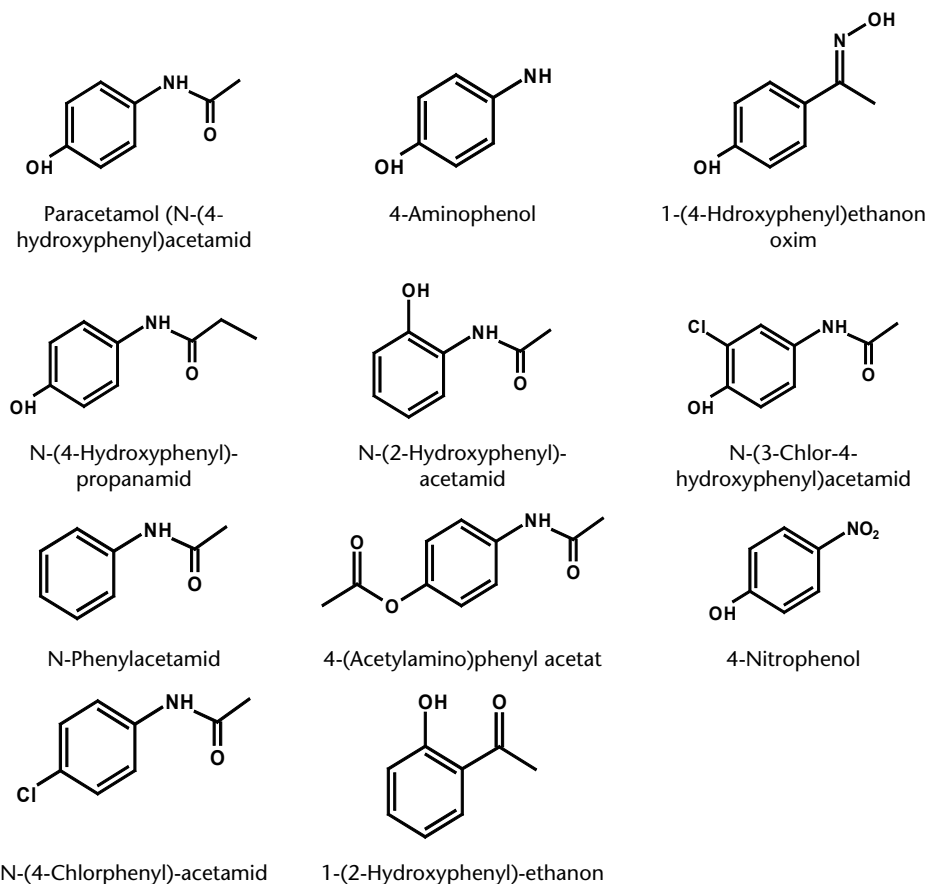


Abb. 2

Chemische Strukturen

Paracetamol und die Prozess-Verunreinigungen basieren auf einer Hydroxyphenyl-Struktur

Methodenparameter

Säule	BlueOrchid 120-1,8 C18, 100 x 2 mm		
Eluent A	Acetonitril		
Eluent B	Phosphatpuffer (pH 3,7)		
Gradient	Zeit [min]	% A	% B
	0,00	13	87
	0,30	13	87
	2,00	70	30
	2,50	70	30
Flussrate	0,8 ml/min		
Injektionsvolumen	1 µl		
Säulentemperatur	50 °C		
Systemdruck	ca. 870 bar		
Detektion	UV bei 245 nm (100 Hz, 0,005 s)		
Laufzeit	3 min		

Ergebnisse

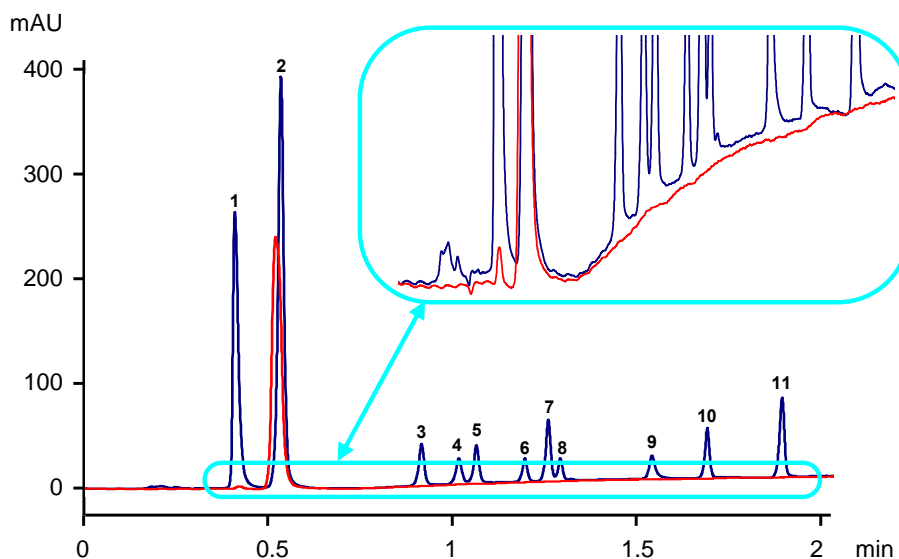


Abb. 3

Trennung von Paracetamol-Gemischen (Standard = blau, Pharmazeutische Formulierung = rot)

Durch Verwendung eines PLATINblue UHPLC-Systems und einer BlueOrchid C18-Säule mit 1,8 µm Partikeln konnte Paracetamol und zehn seiner typischen Verunreinigungen erfolgreich in weniger als 2 min getrennt werden (Abb. 3). Das ist mehr als 3-mal schneller als die optimierte Gradientenmethode per Standard-HPLC [4] und mehr als 15 mal schneller als die isokratische Methode, die die europäische Pharmakopeia vorschlägt. Außerdem benötigt die UHPLC-Methode nur ein Fünftel des Probenvolumens und verringert den Eluentenverbrauch um mehr als 80%.

Die Analyse der Medikament-Formulierung zeigte deutlich nur eine Spurenmenge von 0,02% (w/w) des Zerfallsprodukts 4-Aminophenol (Peak 1).

Die Nachweisgrenze (limit of detection, LOD) lag für alle Verbindungen im Bereich von 0,01 bis 0,08 µg/ml. Die Präzision der Retentionszeiten der UHPLC-Methode lag für die unterschiedlichen Verbindungen zwischen 0,1 und 0,7% RSD (n = 5).

Leistungsdaten der Methode

Nachweisgrenze (LOD)	0,01 – 0,08 µg/ml Bereich (S/N = 3)
Linearität (r²)	0,999885-0,99993
Linearitätsbereich	0,1 – 100 ng
Retentionszeitpräzision*	< 1% RSD
Peakflächenpräzision*	< 3% RSD

*Reproduzierbarkeit über 5 Wiederholungsläufe berechnet

Schlussfolgerung

Die schnelle Analyse von Paracetamol und seinen typischen Verunreinigungen in einer pharmazeutischen Formulierung verdeutlicht wie Analytiklaboratorien von sub-2 µm Säulen wie BlueOrchid und einem UHPLC-System wie PLATINblue profitieren können. Die Vorteile sind schnellere Trennungen, höhere Auflösung, höhere Empfindlichkeit und reduzierter Eluentenverbrauch.

Literatur

- [1] Nageswara Rao R.; Narasaraju A. Analytical Science, Vol. 22, 287-292 (2006)
- [2] Nageralli B.S.; Seetharamappa J.; Gowda B.G.; Melwanki M. Journal of Chromatography B, Vol. 798, Number 1, 49-54 (2003)
- [3] European Pharmacopoeia Monograph Paracetamol 01/2005:0049 / 2.2.29
- [4] KNAUER, Applications Journal, V7801, 07/2008, 79, at www.knauer.net

Autoren

Silvia Marten, Leiterin Abteilung Säulen und Applikationen, KNAUER

Anke Knöfel, Abteilung Säulen und Applikationen, KNAUER

Physikalische Eigenschaften der empfohlenen Säulen



Stationäre Phase	BlueOrchid 120-1.8 C18
USP Code	L1
Porengröße	120 Å
Spezifisches Porenvolumen	0,98 ml/g
Spezifische Oberfläche	320 m ² /g
Partikelgröße	1,8 µm
Form	sphärisch
% C	19
Endcapping	Ja
Abmessungen	100 x 2 mm
Bestellnummer	10BF181BOE

Empfohlenes System



Die Hochgeschwindigkeitsanalyse wurde mit einem KNAUER HD-Gradientensystem PLATINblue durchgeführt, das mit zwei P-1 Pumpen, Degasser-Einheit M-1, Autosampler AS-1, Säulenofen und Detektor MW-1 ausgestattet war.

Beschreibung	Bestellnummer
PLATINblue Pump P-1 (2x), inkl. Pumpenkopf	A60013
PLATINblue Degasser M-1	A60501
SmartMix 100	A5350
PLATINblue Autosampler AS-1	A63500
Column Oven	A0585
PLATINblue Detector MW-1	A61031
3 mm Flusszelle	A4042
ChromGate Software	A1456

Kontakt

Wissenschaftliche Gerätebau
Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH
Hegauer Weg 38
14163 Berlin, Germany

Tel: +49 (0)30 / 809727-0
Fax: +49 (0)30 / 8015010
E-Mail: info@knauer.net
Internet: www.knauer.net