

Marina Galović

**Razvoj nove kapilarnoelektroforetske metode
za analizu febuksostata i
njegovih onečišćenja**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za Analitiku lijekova pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Mirande Sertić.

Zahvala:

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Mirandi Sertić na iskazanom povjerenju, stručnom vodstvu i savjetima tijekom izrade diplomskog rada.

Želim se zahvaliti i svim djelatnicima Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu koji su svojim radom doprinijeli u stjecanju mog znanja u struci i oko nje.

Također, zahvaljujem se svim kolegama koji su mi vrijeme provedeno na fakultetu uljepšali svojim prisustvom.

Na kraju bih se zahvalila roditeljima na moralnoj podršci te povjerenju koje su mi ukazali tijekom studija i bez kojih sve što sam postigla ne bi bilo moguće.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Onečišćenja u lijekovima.....	1
1.1.1. Vrste onečišćenja.....	1
1.2. Kapilarna elektroforeza	8
2. OBRAZLOŽENJE TEME	11
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1. MATERIJALI.....	12
3.1.1. Kemikalije	12
3.1.2. Radni instrumenti	12
3.1.3. Pribor.....	12
3.1.4. Programski paketi.....	13
3.2. METODE.....	13
3.2.1. Priprema instrumenta	13
3.2.2. Priprema standardnih otopina.....	13
3.2.3. Priprema radnog pufera	14
3.2.4. Analiza uzorka.....	14
4. REZULTATI I RASPRAVA	15
5. ZAKLJUČAK	23
6. LITERATURA.....	24
7. SAŽETAK / SUMMERY	25
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	

1. UVOD

1.1. Onečišćenja u lijekovima

Kontrola kvalitete sastavni je dio svih modernih industrijskih procesa. Farmaceutska industrija nije iznimka već primjer drugima. Testiranje farmaceutskog proizvoda uključuje kemijske, fizičke i mikrobiološke analize.

Onečišćenja u lijekovima su nepoželjne tvari zaostale iz proizvodnog procesa. Također, mogu nastati tijekom procesa oblikovanja lijekovitog oblika ili skladištenja. Zahtjevi za kakvoću lijekova definiraju granice za onečišćenja koja se dopuštaju u roku valjanosti. Standarde i pravilnike o onečišćenjima u lijekovima donosi Međunarodna konferencija o harmonizaciji (engl. *International Conference on Harmonization, ICH*), osnovana 1990. godine. ICH smjernice usvojila su regulatorna tijela na području Europske unije, SAD-a i Japana. Prema ICH smjernicama, onečišćenje je svaki sastojak lijekovite tvari koji nema definiran kemijski entitet kao lijekovita tvar ili svaki sastojak farmaceutskog proizvoda koji nije lijekovita ili pomoćna tvar u proizvodu (ICH Q3A(R2)). Onečišćenja mogu imati neželjene farmakološke učinke i toksična svojstva. Nadalje, mogu utjecati na aktivnost i stabilnost aktivne tvari, promijeniti njezinu bioraspoloživost te posljedično promijeniti djelotvornost lijeka. Zbog navedenih razloga zahtjevi za kvalitetom sve su veći, međutim treba izbjeći pretjerano pročišćavanje jer time povećavamo cijenu lijeka. Kako cijena ne bi rasla, bitno je pronaći i optimizirati tehnike koje će uz mali trošak dati valjane rezultate.

1.1.1. Vrste onečišćenja

Dva su osnovna ICH dokumenta koja se bave onečišćenjima u novoj lijekovitoj tvari i novom farmaceutskom proizvodu (ICH Q3A(R2), ICH Q3B(R2)). Dokument *Impurities in New Drug Substances, Q3A(R2)* daje smjernice za kontrolu onečišćenja u novoj lijekovitoj tvari proizvedenoj kemijskom sintezom i koja nije prethodno registrirana u nekoj od zemalja članica. Definirani pragovi za prisutna onečišćenja ne odnose se na lijekovite tvari dobivene biološkim ili biotehnološkim putem, peptide, oligonukleotide, radiofarmaceutike, fermentacijske i polusintetske proizvode, biljne proizvode te proizvode iz biljnog i životinjskog podrijetla. Smjernice se također ne odnose na nove lijekovite supstancije koje se koriste u fazi kliničkih ispitivanja (ICH Q3A(R2)).

Prema ICH smjernicama, onečišćenja se mogu podijeliti u četiri skupine: organska onečišćenja, anorganska onečišćenja, ostatna otapala i onečišćenja metalima.

Organska onečišćenja mogu nastati tijekom procesa proizvodnje ili skladištenja. Dijelimo ih na identificirana i neidentificirana te hlapljiva i nehlapljiva. U tu kategoriju pripadaju početni reaktanti, međuprodukti, nusprodukti i razgradni produkti te, rjeđe, reagensi, ligandi i katalizatori.

Anorganska onečišćenja uglavnom zaostaju tijekom proizvodnje gdje se koriste kao katalizatori, reagensi i ligandi.

Ostatna otapala su organskog ili anorganskog podrijetla, a koriste se kao otapala za pripremu otopina ili suspenzija tijekom sinteze.

ICH smjernice onečišćenja razmatraju na dva načina – kemijski i biološki. Kemijski dio obuhvaća identifikaciju onečišćenja, postavljanje zahtjeva i maksimalne količine onečišćenja, izradu izvještaja te daje osvrt na analitičke metode. Biološki dio obuhvaća smjernice za onečišćenja koja se nalaze u većoj količini od one koja je propisana za ispitivanje sigurnosti primjene lijeka.

Specifikacija za novu ljekovitu tvar treba sadržavati popis nečistoća. Ispitivanja stabilnosti, kemijske studije sinteze i rutinske analize mogu pomoći kod predviđanja onečišćenja koja će se pojaviti u proizvodu. Svako onečišćenje s definiranim karakteristikama svrstava se u specificirana onečišćenja. Ona mogu biti identificirana i neidentificirana. Postupci i pretpostavke koje su se koristile prilikom utvrđivanja razine neidentificiranih onečišćenja trebaju se jasno navesti. Opisuju se kvalitativnim svojstvima, npr. vremenom zadržavanja koje je specifično za pojedini analit. Identificirana onečišćenja su ona za koje je poznata kemijska struktura (Nigović, 2014a).

Za sve vrste onečišćenja postoje pragovi (engl. *threshold limits*) koncentracija iznad kojih treba napraviti dodatne analize. Pragovi se određuju s obzirom na maksimalnu dnevnu dozu lijeka (najviša doza koju pacijent može unijeti tijekom 24 sata) ovisno o tome iznosi li doza manje ili više od 2 g dnevno. Pragovi izvještavanja o prisutnim onečišćenjima odnose se na udio iznad kojeg je potrebno priložiti izjavu o onečišćenjima (uključuje postotak i metodu analize). Ako je dnevna doza ≤ 2 g potrebno je u izjavi navesti svako onečišćenje koje se pojavljuje u količini $> 0,05$ %. Za doze > 2 g navode se sva onečišćenja prisutna $> 0,03$ %. Dakle, ako je dnevni unos lijeka veći, zahtjev za onečišćenje je stroži (Nigović i Sertić, 2012). Raspodjelu pragova prikazuje Tablica 1.

Tablica 1. Pragovi izvještavanja, identifikacije i kvalifikacije za onečišćenja u novoj ljekovitoj tvari

Maksimalna dnevna doza	Prag izvještavanja	Prag identifikacije	Prag kvalifikacije
≤ 2 g	0,05 %	0,10 % ili 1,0 mg/dan unosa (manji iznos)	0,15 % ili 1,0 mg/dan unosa (manji iznos)
> 2 g	0,03 %	0,05 %	0,05 %

Prag identifikacije, tj. karakterizacija kemijske strukture potrebna je za svako onečišćenje prisutno u količini > 0,1 % za dnevnu dozu ljekovite tvari ≤ 2 g, dok je za doze > 2 g potrebna strukturna karakterizacija za onečišćenja prisutna od 0,05 %. Prag kvalifikacije odnosi se na biološku sigurnost određenog onečišćenja. Ako onečišćenje ima farmakološki učinak ili je toksično, moguće je postaviti niže ili više pragove. Kvalifikacija je posebno važna kod nekih lijekova za koje je dokazano da su pojedine nečistoće povezane s povećanjem učestalosti nuspojava kod pacijenata. U tom slučaju opravdano je sniziti prag kvalifikacije (ICH Q3A(R2)).

Dokument *Impurities in New Drug Products, Q3B(R2)* daje smjernice za prijavu onečišćenja u novim ljekovitim oblicima koji su proizvedeni iz nove ljekovite tvari koja nije prethodno registrirana u državi regije ili članice ICH konferencije. Odnosi se na ona onečišćenja koja su klasificirana kao razgradni produkti ljekovite tvari i kao novi produkti nastali reakcijom ljekovite i pomoćne tvari i/ili s dijelovima spremnika. Podnositelj zahtjeva treba sumirati razgradne produkte uočene tijekom proizvodnje i/ili studija stabilnosti nove ljekovite tvari. Svi razgradni produkti dobiveni u studijama stabilnosti trebaju biti identificirani ako su prisutni u razini većoj od navedene u Tablici 2. Ako je maksimalna dnevna doza lijeka manja od 1 g, razgradni produkti trebaju se navesti ukoliko se nalaze u količini > 0,1 %. Pragovi identifikacije i kvalifikacije također su prilagođeni maksimalnom dnevnom unosu. Ako identifikacija razgradnog produkta nije moguća, u dokumentaciji treba priložiti laboratorijske testove koji to dokazuju (ICH Q3B(R2)).

Tablica 2. Pragovi izvještavanja, identifikacije i kvalifikacije za onečišćenja prisutna u novom ljekovitom obliku

Maksimalna dnevna doza	Prag izvještavanja	Maksimalna dnevna doza	Prag identifikacije	Maksimalna dnevna doza	Prag kvalifikacije
≤ 1 g	0,1 %	< 1 mg	1,0 % ili 5 µg/dn unosa (manji iznos)	< 10 mg	1.0 % ili 50 µg/dn unosa (manji iznos)
> 1 g	0,05 %	1-10 mg	0,5 % ili 20 µg/dn unosa (manji iznos)	10-100 mg	0.5 % ili 200 µg/dn unosa (manji iznos)
		> 10 mg – 2 g	0,2 % ili 2 mg/dn unosa (manji iznos)	> 100 mg – 2 g	0.2 % ili 3 mg/dn unosa (manji iznos)
		> 2 g	0,10 %	> 2 g	0,15 %

Zahtjev za registraciju lijeka treba uključivati dokumentirane dokaze o validaciji analitičkih postupaka koji su se koristili za detekciju i kvantifikaciju razgradnih produkata. Validacija sadržava analizu pod odgovarajućim stres uvjetima – svjetlost, toplina, vlažnost, hidroliza kiseline/baze i oksidacija. Ako se tijekom analitičkog postupaka otkrije prisutnost drugih pikova, uz promatrani razgradni produkt, oni također trebaju biti navedeni i objašnjeni.

Dokument *Impurities: Guideline for Residual Solvents, Q3C(R5)* daje smjernice za prihvatljive količine ostatnih otapala u lijekovima radi sigurnosti pacijenata. Smjernice sugeriraju upotrebu manje toksičnih otapala i određuju granice koje se smatraju toksikološki prihvatljive za pojedina otapala. Ostatna otapala definiraju se kao organske, hlapljive kemikalije koje se koriste ili su proizvedene tijekom proizvodnje lijeka ili pomoćne tvari. Odgovarajući izbor otapala za sintezu lijeka može povećati prinos ili odrediti karakteristike poput kristalnog oblika, čistoće i topljivosti.

Budući da otapala nemaju terapeutska svojstva, trebaju se ukloniti u najvećoj mogućoj mjeri kako bi se zadovoljili kriteriji kvalitete. Lijekovi ne smiju sadržavati ostatna otapala u količini većoj od propisane. Prema toksičnosti, dijelimo ih u četiri skupine (ICH Q3C(R5)). Prvu grupu čine otapala koja treba izbjegavati (*Class 1*). Njihove koncentracijske limite te svojstva prikazuje Tablica 3.

Tablica 3. Class I otapala u farmaceutskim proizvodima (otapala koja treba izbjegavati)

OTAPALO	KONCENTRACIJSKI LIMIT (ppm)	SVOJSTVO
Benzen	2	Karcinogen
Tetraklormetan	4	Toksičan, opasno za okoliš
1,2 – dikloretan	5	Toksičan
1,1 – dikloretan	8	Toksičan
1,1,1 – trikloretan	1500	Opasno za okoliš

Drugu skupinu čine otapala koja moraju biti ograničena (*Class II*), a prikazuje ih Tablica 4. PDE je kratica za dopušteno dnevno izlaganje (engl. *Permitted Daily Exposure, PDE*). Koncentracijski limit računa se prema formuli:

$$\text{Koncentracija (ppm)} = \frac{1000 * \text{PDE} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dnevno}} \right)}{\text{doza} \left(\frac{\text{g}}{\text{dnevno}} \right)}$$

Tablica 4. Class II otapala u farmaceutskim proizvodima (otapala koja moraju biti ograničena)

OTAPALO	PDE (mg/dnevno)	KONCENTRACIJSKI LIMIT (PPM)
Acetonitril	4,1	410
Kloroenzen	3,6	360
Kloroform	0,6	60
Kumen	0,7	70
Cikloheksan	38,8	3880
1,2-dikloroetan	18,7	1870
Diklorometan	6,0	600
1,2-dimetoksietan	1,0	100
N,N-dimetilacetamid	10,9	1090
N,N-dimetilformamid	8,8	880
1,4-dioksan	3,8	380
2-etoksietanol	1,6	160
Etilenglikol	6,2	620

Formamid	2,2	220
Heksan	2,9	290
Metanol	30,0	3000
Metoksietanol	0,5	50
Metilbutil keton	0,5	50
Metilcikloheksan	11,8	1180
N-metilpirolidon	5,3	530
Nitrometan	0,5	50
Piridin	2,0	200
Sulfolan	1,6	160
Tetrahidrofuran	7,2	720
Tetralin	1,0	100
Toluen	8,9	890
1,1,2-trikloroetan	0,8	80
Ksilen	21,7	2170

Treća skupina odnosi se na otapala s niskim toksičnim potencijalom (*Class III*). Njihovo štetno djelovanje putem lijekova na ljudsko zdravlje dosad nije poznato. Međutim, nema studija koje dokazuju da nisu kancerogeni ili štetni tijekom dugotrajnog izlaganja. Iz tog razloga dopuštene su količine tih otapala u lijekovima od 50 mg/dn ili manje (što odgovara 5000 ppm ili 0.5 %) bez obrazloženja. Otapala iz *Class III* skupine navedena su u Tablici 5.

Tablica 5. Class III otapala u farmaceutskim proizvodima (otapala s niskim toksičnim potencijalom)

Octena kiselina	2-butanol	Etanol	Heptan
Aceton	Butil acetat	Etil acetat	Izobutil acetat
Anisol	Terc-butilmetil eter	Etilni eter	Izopropil acetat
1-butanol	Dimetil sulfoksid	Mravlja kiselina	Metil acetat
3-metil-1-butanol	Metiletil keton	2-metil-1-propanol	Pentan
1-pentanol	1-propanol	2-propanol	Propil acetat

Zadnju skupinu, *Class IV*, čine otapala za koja nema pronađenih toksikoloških podataka i smatramo ih najsigurnijima (Tablica 6).

Tablica 6. *Class IV* otapala u farmaceutskim proizvodima (otapala za koja nema pronađenih toksikoloških podataka)

1,1-dietoksiopropan	1,1-dimetoksimetan
Izopropilni eter	Metilizopropil keton
Trikloroacetna kiselina	Trifluoroacetna kiselina
2,2-dimetoksiopropan	Izooktan
Metiltetrahidrofuran	Petrolej eter

Dokument *Guideline for Elemental Impurities (Q3D)* najnoviji je među dokumentima o onečišćenjima. Elementarna onečišćenja u ljekovitim tvarima potječu iz više izvora – kao dijelovi katalizatora, spremnika, opreme ili kao dio tvari koje se koriste u sintezi. Količina elementarnih onečišćenja u ljekovitom obliku mora biti unutar zadanih granica koje definira navedeni dokument. Elementi koju su obuhvaćeni ovim dokumentom podijeljeni su u tri skupine prema toksičnosti i vjerojatnošću da se nađu u ljekovitom obliku (ICH Q3D; Smolčić, 2015).

U prvu skupinu (*Class I*) spadaju As, Cd, Hg i Pb. Oni su ljudski toksikanti i njihova uporaba u proizvodnji lijekova je striktno ograničena ili zabranjena. Drugu skupinu (*Class II*) većinom čine toksikanti ovisni o putu primjene. *Class II* podijeljena je na dvije podskupine, *Class 2A* i *Class 2B*, ovisno o vjerojatnosti pojavljivanja elemenata u ljekovitim oblicima. *Class 2A* čine elementi Co, Ni i V, imaju relativno visoku vjerojatnost pojavljivanja u ljekovitim oblicima i time zahtijevaju procjenu rizika u svim mogućim izvorima elementarnih nečistoća i načinima primjene. *Class 2B* obuhvaća Ag, Au, Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Se i Tl, elemente koji se rjeđe pojavljuju u ljekovitim oblicima. Mogu se isključiti iz procjene rizika, osim ako se namjerno dodaju tijekom proizvodnje ljekovitih ili pomoćnih tvari (ICH Q3D).

Class III elementi (Ba, Cr, Cu, Li, Mo, Sb i Sn) su relativno niske toksičnosti kada su primijenjeni oralno, ali zahtijevaju procjenu rizika za inhalacije i parenteralnu primjenu (osim ako je PDE > 500 µg/dnevno).

Sukladno povećanju zahtjeva u kontroli kakvoće lijekova i određivanju onečišćenja razvijaju se nove analitičke metode kako bi se zadovoljili zahtjevi industrije i regulatornih tijela, a pacijenti opskrbi što kvalitetnijim lijekom koji je siguran za upotrebu. Za odjeljivanje sastavnica smjese ljevakovite tvari i njezinih onečišćenja koriste se separacijske tehnike. Najčešće se primjenjuju tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), plinska kromatografija (GC), tankoslojna kromatografija (TLC), tankoslojna kromatografija visoke djelotvornosti (HPTLC) i kapilarna elektroforeza (CE).

1.2. Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza (CE) je separacijska tehnika. Sastoji se od kapilare koja je uronjena u dvije otopine pufera i spojena na izvor struje. Uzimanje uzorka pod tlakom je automatizirano iz bočice u kojoj se uzorak nalazi. Nakon što je uzorak injektiran, kapilara se uronjava u bočicu s puferom. Kapilare su dugačke 50 – 100 cm i široke 50 – 500 μm . Na mjestu detektora spaljen je omotač kapilare kako bi bila transparentna za detektor (najčešće je to DAD detektor). Razdvajanje analita temelji se na razlici u brzini putovanja iona pod utjecajem električnog polja unutar kapilare. Brzinu iona opisuje formula:

$$v = \mu_e E$$

gdje v označuje brzinu putovanja iona, μ_e elektroforetsku pokretljivost, a E primijenjeno električno polje. Električno polje izražava se u V/cm i ovisi o duljini korištene kapilare te o potencijalu koji je primijenjen kroz nju. Što je električno polje veće, to se ioni brže kreću kroz kapilaru, prema formuli:

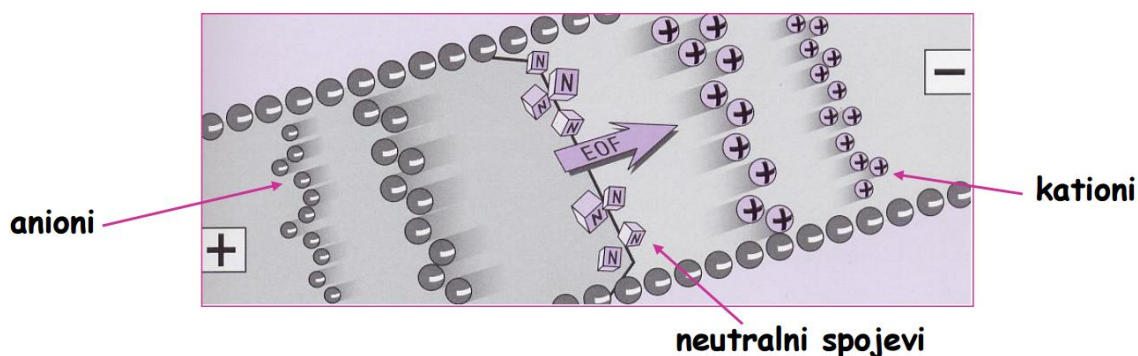
$$\mu_e = q/6\pi\eta r$$

q označava naboj iona, η viskoznost medija te r radijus iona. Kad električno polje povećamo iznad granice kod koje su trenje i električno polje jednaki, ioni se počinju kretati. Također, iz formule je vidljivo da što je veće električno polje te što je manji ion, veća je brzina putovanja iona. Na brzinu utječe i pK_a vrijednost molekule i pH pufera – što je ion nabijeniji, brzina mu je veća (Watson, 1999).

Za kapilarnu elektroforezu karakteristične su dvije stvari – razlika u pokretljivosti iona kod različitih pH vrijednosti te elektroosmotski tok (engl. *Electroosmotic flow*, EOF). Elektroosmotski tok je tok čistog pufera u kapilari, a nastaje kao posljedica površinskog naboja na unutrašnjoj stijenci kapilare gdje se nalaze silanolne skupine čiji stupanj ionizacije ovisi o pH. Kako se u kapilari nalazi otopina elektrolita, negativno nabijene silanolne skupine privlače

katione te nastaje električni dvosloj koji se sastoji od čvrstog dijela i difuzijskog dijela. Pod djelovanjem električnog polja kationi u difuznom sloju električnog dvosloja putuju prema negativno nabijenoj katodi (Nigović, 2014b). Jačina EOF ovisna je o pH budući da naboj silanolnih skupina raste s pH. Elektroosmotski tok, za razliku od laminarnog toka otapala u HPLC-u, daje uže i više pikove.

Djelovanjem električnog polja analiti putuju različitom brzinom ovisno o njihovom naboju i ionskom radijusu. Najbrže se kreću kationi koje pokreće ionska pokretljivost prema katodi i EOF. Mali kationi kreću se brže od većih. Zatim slijede neutralne molekule, koje putuju kapilaram zbog elektroosmotskog toka i kreću se brzinom elektroosmotskog toka. Posljednji prema katodi putuju anioni budući da ih njihova ionska pokretljivost usmjeruje prema anodi, ali se zbog EOF-a svejedno kreću u smjeru katode (Slika 1). Ono što ovu metodu čini posebnom jest da iako se radi o elektroforezi možemo analizirati i neutralne analite dodatkom surfaktanta u otopinu radnog pufera (Sertić, 2013).



Slika 1. Elektroosmotski tok i redoslijed kretanja molekula kroz kapilaru u kapilarnoj elektroforezi (Nigović, 2014b)

Elektroosmotski tok moguće je modificirati promjenom ili dodatkom nekih tvari što prikazuje Tablica 7 (Watson 1999; Nigović, 2014b).

Tablica 7. Utjecaj raznih parametara na elektroosmotski tok

PARAMETAR	ELEKTROOSMOTSKI TOK
pH pufera	Raste s porastom pH
Ionska jakost pufera	Smanjuje se porastom ionske jakosti
Električno polje	Raste porastom napona
Temperatura	Povećana temperatura smanjuje viskoznost i povećava protok
Dodatak organskog otapala	Smanjuje EOF
Površinski aktivne tvari	Kationske – smanjuju EOF Anionske – povećavaju EOF
Modificiranje unutrašnje stjenke kapilare	Neutralni sloj smanjuje, ionski povećava

Do danas je razvijeno više vrste kapilarne elektroforeze (npr. kapilarna zonska elektroforeza, kapilarna gelska elektroforeza, kapilarno izoelektrično fokusiranje) i svaka se primjenjuje za određene analize. Prednosti kapilarne elektroforeze su kratko vrijeme analize, vrlo mali volumeni uzoraka i otapala, visoka učinkovitost, različiti mehanizmi razdvajanja koji omogućuju analizu svih vrsta analita, pristupačna cijena i ekološka prihvatljivost. U ovom radu korištena je micelarna elektrokinetička kromatografija (engl. *Micellar electrokinetic chromatography*, MEKC) u analizi onečišćenja febuksostata.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Zbog ubrzanog rasta farmaceutske industrije razvoj novih analitičkih metoda od velikog je značaja. Febuksostat je novi lijek za giht koji se u kliničkim istraživanjima pokazao znatno učinkovitijim u snižavanju razine mokraćne kiseline u serumu u odnosu na liječenje uobičajeno korištenim dozama alopurinola. Budući da svi ljekoviti oblici prolaze kontrolu kvalitete prije stavljanja na tržište, cilj ovog rada bio je razviti metodu za što bržu, istovremenu analizu febuksostata i njegovih triju onečišćenja u gotovim ljekovitim oblicima. Korištena je micelarna elektrokinetička kromatografija zbog kratkog vremena analize i ekološke prihvatljivost jer se koriste mali volumeni uzoraka i otapala.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

Acetonitril, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)

Dimetilformamid (Merck, Darmstadt, Njemačka)

Dimetilsulfoksid (Merck, Darmstadt, Njemačka)

Natrij dodecil sulfat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)

Natrij tetraborat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

1 M NaOH (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

0,1 M NaOH (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

Standardi:

- Febuxostat <2-(3-Febuxostat<2-(3-cyano-4-isobutoxyphenyl)-4-methyl-1,3-thiazole-5-carboxylic acid> (TLC Pharmaceutical Standards Ltd, Ontario, Canada)
- Ethylfebuxostat <Ethyl 2-(3-cyano-4-isobutoxyphenyl)-4-methylthiazole-5-carboxylate> (TLC Pharmaceutical Standards Ltd, Ontario, Canada)
- Febuxostatamide <2-(3-carbamoyl-4-isobutoxyphenyl)-4-methylthiamazole-5-carboxylic acid> (TLC Pharmaceutical Standards Ltd, Ontario, Canada)
- Febuxostat DEE <2-(3-(ethoxycarbonil)-4-isobutoxyphenyl)-4-methylthiazol-5-carboxylic acid> (TLC Pharmaceutical Standards Ltd, Ontario, Canada)
- Pravastatin (Pliva, Zagreb, Hrvatska)

Ultračista voda (Labconco, Kansas City, MI, SAD)

3.1.2. Radni instrumenti

Analitička vaga, model AG245 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)

Uređaj za kapilarnu elektroforezu, G1600A (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

Ultrazvučna kupelj (Elma, Singen, Njemačka)

3.1.3. Pribor

Bočice za uzorkovanje, 1,5 mL (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

Injekcijski filtri Acrodisc GHP, veličina pora 0,20 μm , promjer 26 mm (Gelman, Ann Arbor SAD)

Kapilara od izvučenog kvarca 32 / 23,5 cm, unutarnji promjer 50 μm (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

3.1.4. Programski paketi

3D-CE/MSD ChemStation, Rev. A. 10.02 (1757) (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, Seattle, WA, SAD)

3.2. METODE

3.2.1. Priprema instrumenta

Postupak prije prvog korištenja kapilare obuhvaća kondicioniranje ispiranjem s 1 M NaOH 20 minuta, zatim s 0,1 M NaOH 20 minuta, potom vodom 10 minuta i otopinom radnog pufera u trajanju od 20 minuta. Na početku radnog dana, već korištena kapilara kondicionira se ispiranjem s 0,1 M NaOH 10 minuta, vodom 10 minuta i otopinom radnog pufera 10 min. Kako bi se osigurala ponovljivost rezultata, između svake analize kapilara se ispire otopinom radnog pufera 2 min. Otopine radnog pufera se zamjene svježe pripremljenim otopinama svakih 5 mjerenja. Na kraju radnog dana ispire se 10 minuta s vodom i 30 minuta s 0,1 M NaOH.

3.2.2. Priprema standardnih otopina

Standardne otopine febuksostata, etil febuksostata i DEE-a pripremljene su otapanjem supstanci u acetonitrilu tako da koncentracije budu 0,5 mg/mL. Pripremljene su dvije standardne otopine febuksostat amida, obje koncentracije 0,5 mg/mL. Prvo, otapanjem supstance u dimetilsulfoksidu (DMSO) te zatim otapanjem u dimetilformamidu razrijeđenim smjesom acetonitrila i vode (80:20), v/v u omjeru 4:10. Unutarnji standard, pravastatin, otopljen je u ultračistoj vodi. Koncentracija standardne otopine pravastatina također iznosi 0,5 mg/mL. Za otapanje u potpunosti otopine su umetnute u ultrazvučnu kupelj na 5 minuta.

3.2.3. Priprema radnog pufera

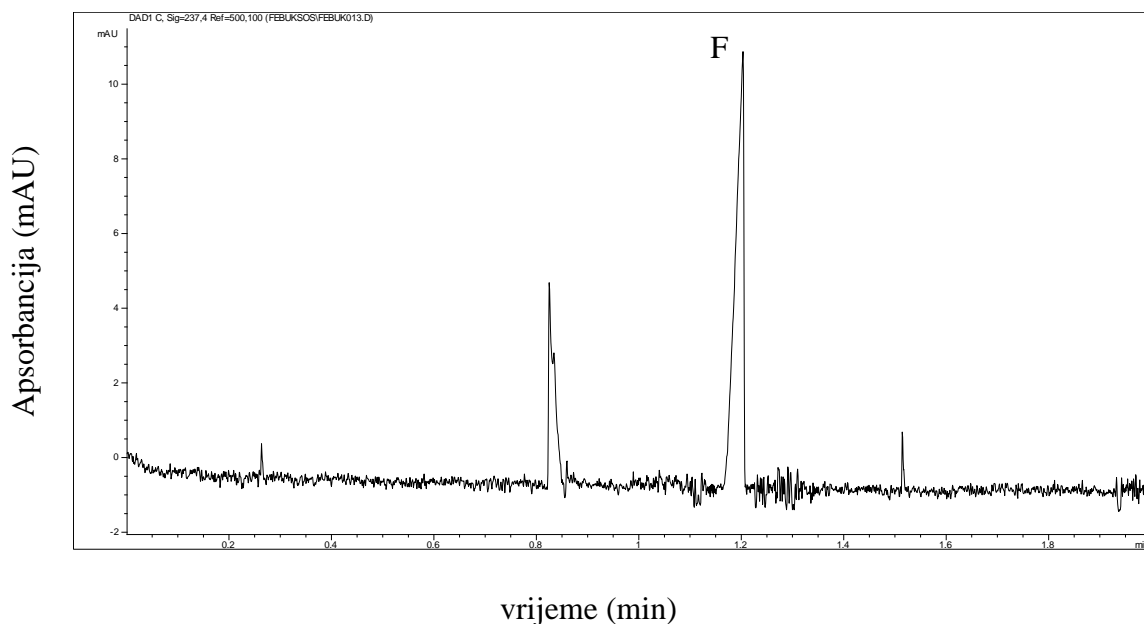
Otopina boratnog pufera koncentracije 100 mM pripremi se vaganjem 1,9096 g natrijevog tetraborata u odmjernoj tikvici od 50,0 mL i nadopuni do oznake ultračistom vodom. Otopina SDS-a koncentracije 100 mM pripremi se vaganjem 1,4419 g u odmjernoj tikvici od 50,0 mL i nadopuni do oznake ultračistom vodom. Otopina radnog pudera pripremi se miješanjem otopine boratnog pufera, otopine SDS-a, vode i organskog otapala u željenim omjerima.

3.2.4. Analiza uzorka

Analiza se provodi na uređaju za kapilarnu elektroforezu koristeći kapilaru od izvučenog kvarca unutarnjeg promjera 50 μm . Otopine radnih pufera pripreme se u 3 bočice. Jedna se koristi za ispiranje kapilare između analiza, a u druge dvije su uronjene elektrode tijekom analize. Prije nego što ih stavimo u bočice za uzorkovanje, otopine filtriramo kroz mikrofilter. Uzorci se injektiraju hidrodinamski pri 50 mbar, 4 s. Analiza se provodi pri valnoj duljini 237 nm.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Razvoj analitičke metode započet je analizom standardne otopine febeksostata. Uzorak, ukupnog volumena 500 μL , sastoji se od 50 μL otopine febeksostata (0,5 mg/mL) i 450 μL ACN. Koncentracija febeksostata u uzorku za analizu iznosi 50 $\mu\text{g/mL}$. Acetonitril daje signal koji je detektiran u prvom piknu. Signal febeksostata pojavljuje se u vremenu 1,2 min (Slika 2). Za analizu je odabrana valna duljina detektora od 237 nm jer je pri njoj apsorbancija febeksostata visoka.

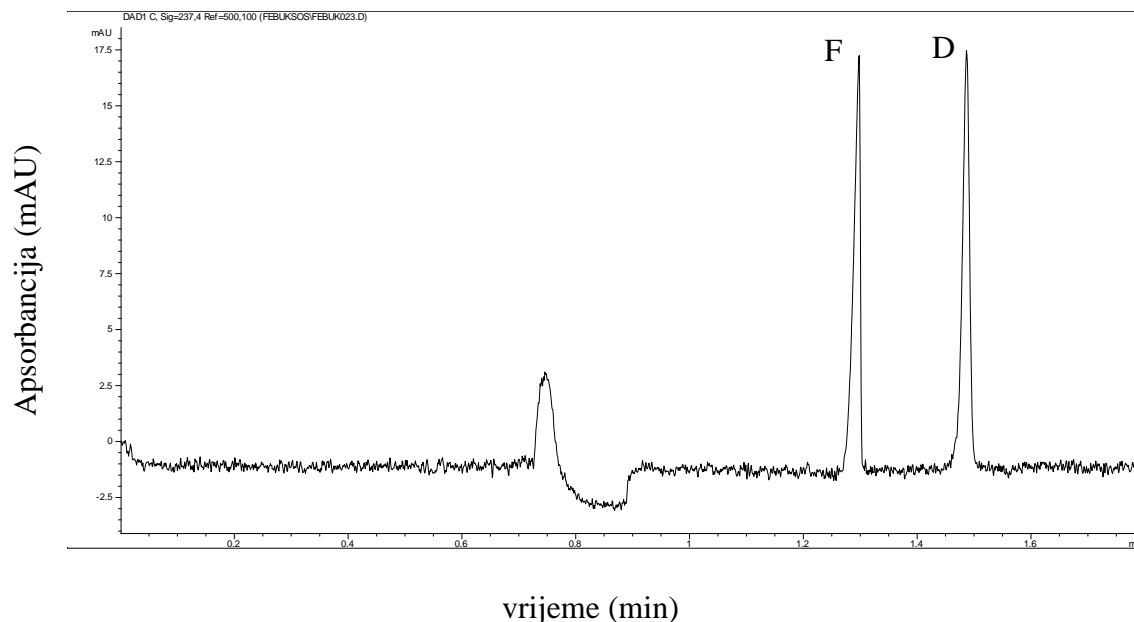


Slika 2. Elektroferogram standardne otopine febeksostata (F, 50 $\mu\text{g/mL}$) u otapalu ACN.

Uvjeti analize: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 20 mM SDS, napon 30 kV, 20 °C, detekcija pri 237 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 4 s.

Sljedeća analiza sastava 50 μL febeksostata i 50 μL DEE-a uz 400 μL smjese ACN:H₂O = 50:50, v/v. Snimljen je elektroferogram pri istim uvjetima iz prethodne analize, međutim, navedena dva analita koeluiraju. Povećanjem koncentracije SDS-a na 50 mM, dobiveno je sljedeće – pikovi febeksostata i DEE-a jasno su razdvojeni, DEE eluira nakon febeksostata (Slika 3). SDS je anionski surfaktant koji stvara micelle kada je njegova koncentracija iznad tzv. kritične micelarne koncentracije. Korištenjem SDS-a u koncentraciji iznad 10 mM dolazi do nastanka micela agregiranjem hidrofobnih i hidrofilnih dijelova molekula SDS-a. Micelle čine pseudostacionarnu fazu te se analiti raspodjeljuju između micela i mobilne faze, tj. pufera što dovodi do usporavanja brzine kretanja analita koji stupaju u interakcije s micelama. Febeksostat ima pKa vrijednost 3,1 te je u lužnatim uvjetima negativno nabijen. Iako su i febeksostat i DEE

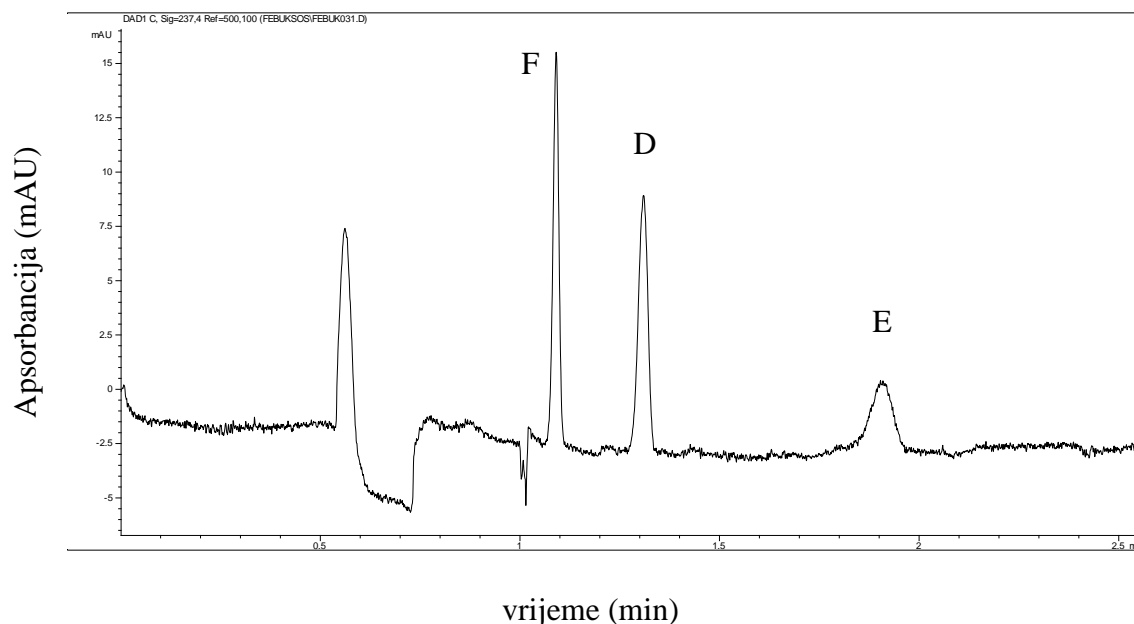
anioni, febuksostat je detektiran prije DEE-a jer ima manji polumjer koji je obrnuto proporcionalan elektroforetskoj pokretljivosti; što je polumjer manji, pokretljivost je veća.



Slika 3. Elektroferogram otopine febuksostata (F, 50 $\mu\text{g/mL}$) i DEE-a (D, 50 $\mu\text{g/mL}$) u otapalu ACN:H₂O = 50:50, v/v.

Uvjeti analize: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 50 mM SDS, napon 30 kV, 20 °C, detekcija pri 237 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 4 s.

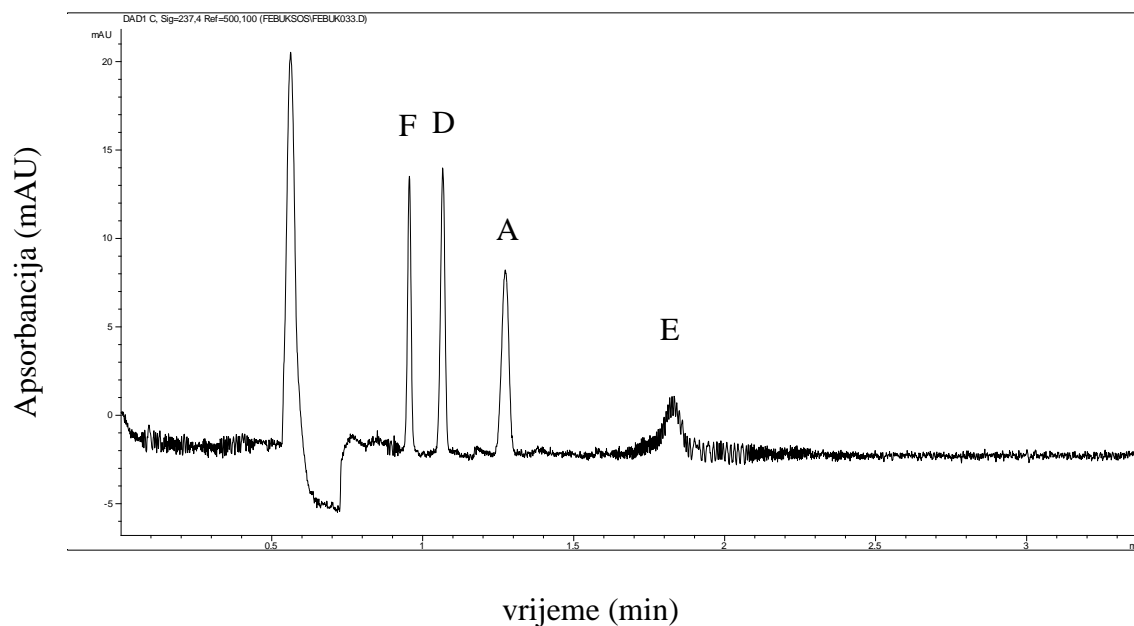
Idući korak u razvoju metode uključuje dodatak etilnog onečišćenja. Uzorak sadrži 50 μL febuksostata, 50 μL DEE-a i 50 μL febuksostat etila nadopunjeno do 500 μL smjesom ACN:H₂O = 50:50, v/v. Na elektroferogramu (Slika 4) se uočava položaj etilnog onečišćenja koji eluira posljednji zato što je najviše stupio u interakcije sa hidrofobnim micelama koje se kreću prema anodi, suprotno od smjera kretanja EOF-a. Za razliku od febuksostata koji ima disociranu karboksilnu skupinu pri pH 9,3 i negativno je nabijen, etilno onečišćenje na toj poziciji ima acetatni ester i molekula je neutralna.



Slika 4. Elektroferogram otopine febuksostata (F, 50 $\mu\text{g/mL}$), DEE-a (D, 50 $\mu\text{g/mL}$) i febuksostat etila (E, 50 $\mu\text{g/mL}$) u otapalu ACN:H₂O = 50:50, v/v.

Uvjeti analize: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 50 mM SDS, napon 30 kV, 20 °C, detekcija pri 237 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 4 s.

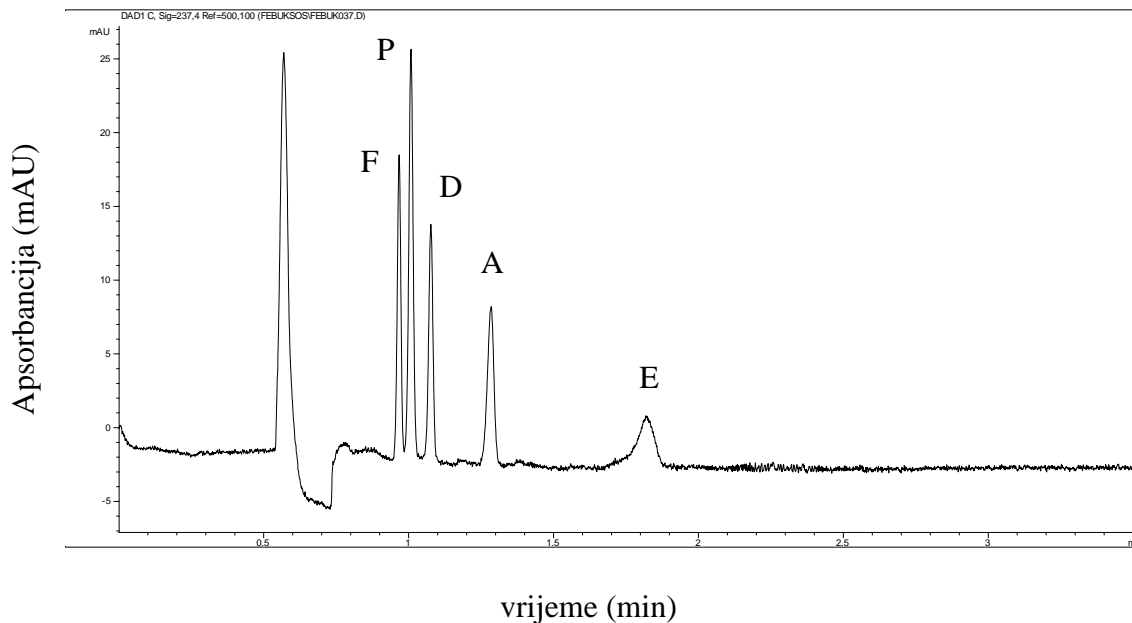
Nakon uspješnog razdjeljenja onečišćenja od febuksostata, dodaje se febuksostat amid koji predstavlja analitički izazov budući da je netopljiv u vodi i ACN. Za otapalo je odabran dimetilsulfoksid (DMSO). U bočici za uzorkovanje pripremi se smjesa 50 μL febuksostata, 50 μL DEE-a, 50 μL febuksostat etila i 50 μL febuksostat amida otopljenog u DMSO nadopunjeno do 500 μL smjesom ACN:H₂O = 50:50, v/v. Elektroferogram prikazuje pik amida koji izlazi u 1,25 min. Analiti, dakle, pri ovim uvjetima analize izlaze sljedećim redom – febuksostat, DEE, amid te etil febuksostata (Slika 5). Dodatak DMSO u smjesu uzrokovao je negativne promjene u širini pika etilnog onečišćenja. Budući da se radi o organskom otapalu, moguće je da DMSO uzrokuje raspada micela SDS-a (Terabe, 1992).



Slika 5. Elektroferogram otopine febuksostata (F, 50 $\mu\text{g/mL}$), DEE-a (D, 50 $\mu\text{g/mL}$), febuksostat etila (E, 50 $\mu\text{g/mL}$) i febuksostat amida (A, 50 $\mu\text{g/mL}$, otopljen u DMSO) u otapalu ACN:H₂O = 50:50, v/v.

Uvjeti analize: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 50 mM SDS, napon 30 kV, 20 °C, detekcija pri 237 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 4 s.

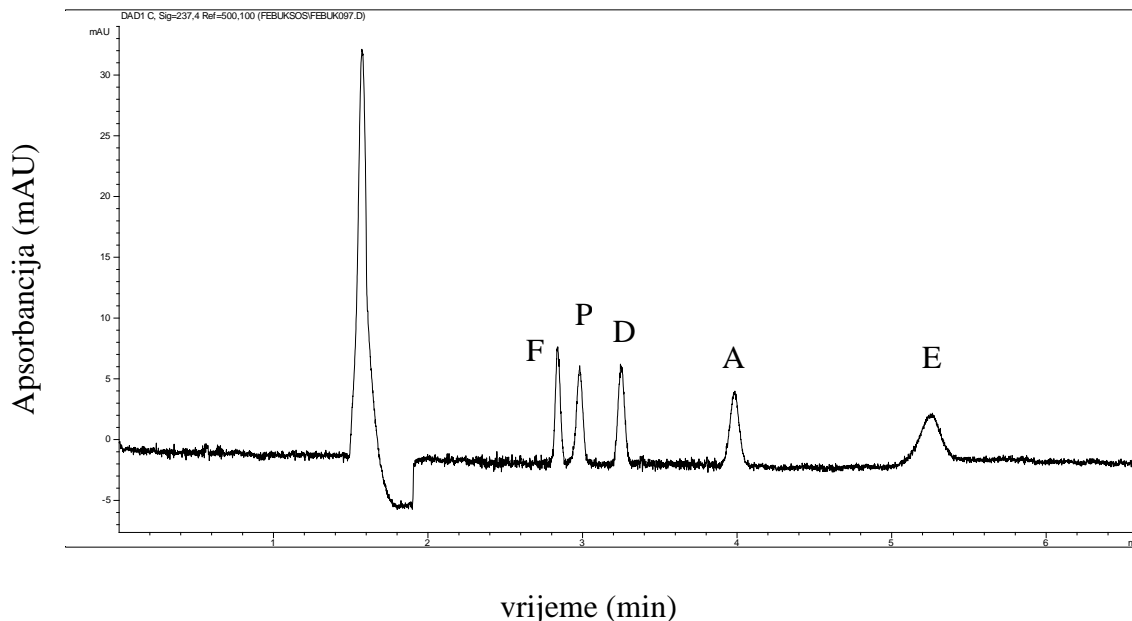
Kako bismo osigurali vjerodostojnost rezultata, u uzorak dodajemo pravastatin kao unutarnji standard. Unutarnji standard je tvar koja nije primarno sadržana u uzroku, a čija su fizikalno-kemijska svojstva što sličnija značajkama analita koji analiziramo. Pravastatin je d-hidroksi kiselina koja epimerizira i laktonizira ovisno o pH. Kod pH > 6 negativno je nabijen jer karboksilna skupina disocira (Nigović, 2008.). Pravastatin je otopljen u vodi i njegova koncentracija iznosi 0,5 mg/mL. Do detektora dolazi nakon febuksostata u vremenu od 1,0 min (Slika 6).



Slika 6. Elektroferogram otopine febuxostata (F, 50 $\mu\text{g/mL}$), DEE-a (D, 50 $\mu\text{g/mL}$), febuxostat etila (E, 50 $\mu\text{g/mL}$), febuxostat amida (A, 50 $\mu\text{g/mL}$; otopljen u DMSO) i pravastatina (P, 50 $\mu\text{g/mL}$) u otapalu ACN:H₂O = 50:50, v/v.

Uvjeti analize: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 50 mM SDS, napon 30 kV, 20 °C, detekcija pri 237 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 4 s.

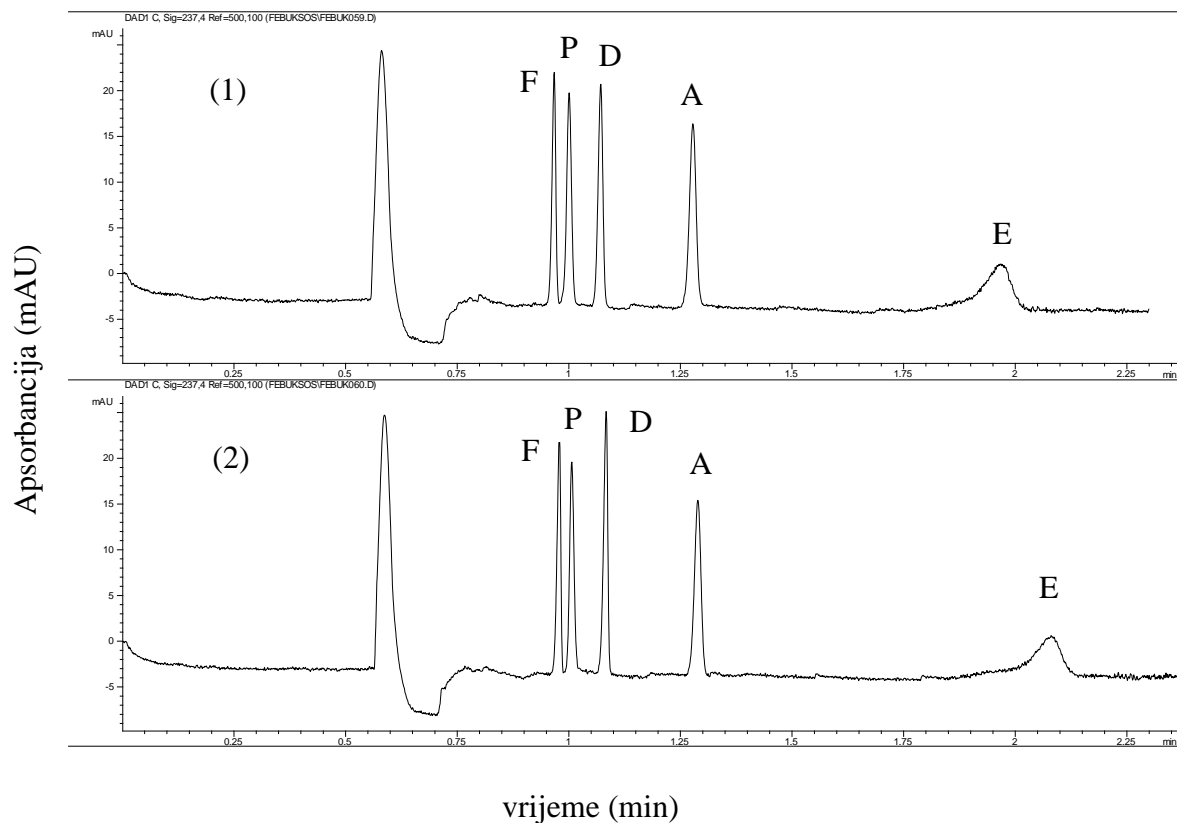
Budući da je pik etilnog onečišćenja neodgovarajućeg oblika, isprobana je modifikacija otapala korištenog za otapanje amidnog onečišćenja zbog sumnje na degradaciju micela prisustvom DMSO-a. Standardna otopina febuxostat amida nanovo je pripremljena otapanjem supstancije u dimetilformamidu razrijeđenim smjesom acetonitrila i vode (80:20), v/v u omjeru 4:10. Rezultate prikazuje elektroferogram na Slici 7. Vidljivo je da su pikovi febuxostata i njegovih onečišćenja približnih površina. Čistoća pika provjerena je preklapanjem spektara dobivenih pomoću DAD detektora sa vrha, sredine i dna pika. Nepravilnosti u čistoći nisu uočene.



Slika 7. Elektroferogram otopine febuksostata (F, 50 $\mu\text{g/mL}$), DEE-a (D, 50 $\mu\text{g/mL}$), febuksostat etila (E, 50 $\mu\text{g/mL}$), febuksostat amida (A, 50 $\mu\text{g/mL}$; otopljen u DMF/ACN/ H_2O) i pravastatina (P, 50 $\mu\text{g/mL}$) u otapalu ACN: H_2O = 50:50, v/v.

Uvjeti analize: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 50 mM SDS, napon 30 kV, 20 °C, detekcija pri 237 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 4 s.

U potrazi za optimizacijom oblika i simetrije pika etilnog onečišćenja, ispitano je nekoliko aditiva koji imaju svojstvo modifikacije. Ciklodekstrini, ciklički oligosaharidi sastavljeni od prstenasto povezanih α -D-glukopiranoznih jedinica stvaraju inkluzijske komplekse s hidrofobnom unutrašnjosti i hidrofilnim vanjskim dijelom zbog kojeg se ne uklapaju u micelle. Budući da se analiti mogu raspodijeliti unutar inkluzijskih kompleksa, ciklodekstrin u otopini s postojećim micelama čini drugu pseudostacionarnu fazu. Nemaju naboj pa se analiti koji su ušli u ciklodekstrin kroz kapilaru kreću brzinom EOF-a (Terabe, 1992). Najčešće su korišteni α -, β -, γ - ciklodekstrini koji se razlikuju po broju glukoznih podjedinica i veličini cilindričnog otvora. U ovom radu ispitan je utjecaj dodatka 10 mM i 15 mM α -ciklodekstrina u otopinu radnog pufera. Na Slici 8. vidljiva je usporedba rezultata – dobiven je pozitivan utjecaj na duljinu trajanja analize i oštrinu pikova, međutim pik etilnog onečišćenja i dalje ostaje neodgovarajućeg oblika.

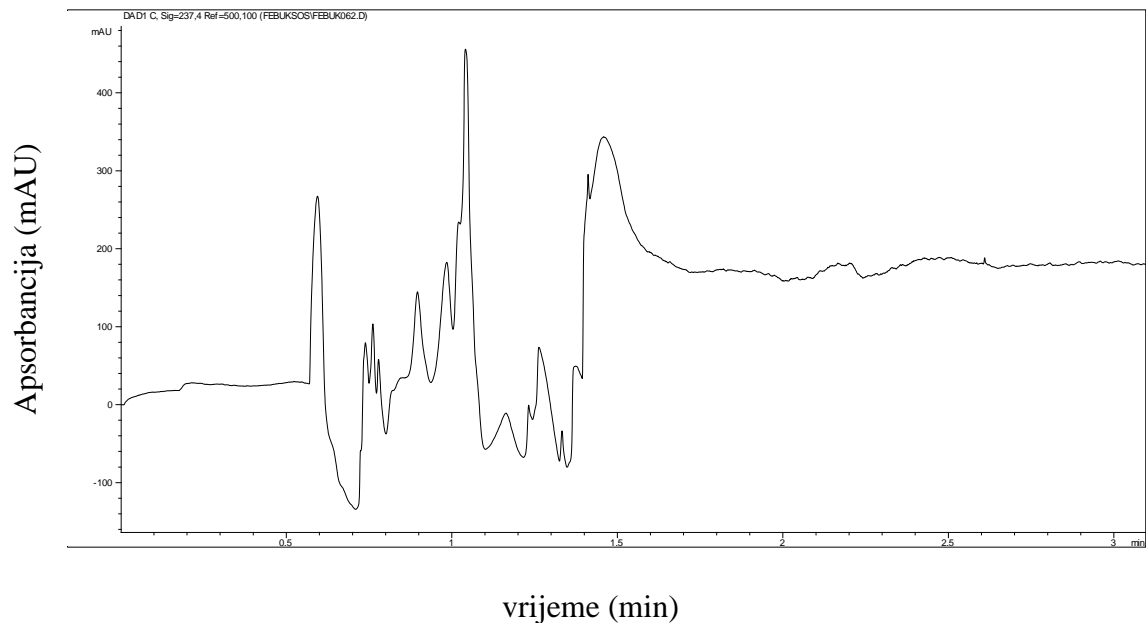


Slika 8. Elektroferogram otopine febuksostata (F, 50 $\mu\text{g/mL}$), DEE-a (D, 50 $\mu\text{g/mL}$), febuksostat etila (E, 50 $\mu\text{g/mL}$), febuksostat amida (A, 50 $\mu\text{g/mL}$; otopljen u DMF/ACN/ H_2O) i pravastatina (P, 50 $\mu\text{g/mL}$) u otapalu ACN: H_2O = 50:50, v/v.

Uvjeti analize:

- (1) 20 mM boratni pufer pH 9,3, 50 mM SDS, 10 mM α -ciklodekstrin, napon 30 kV, 20 $^\circ\text{C}$, detekcija pri 237 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 4 s
- (2) 20 mM boratni pufer pH 9,3, 50 mM SDS, 15 mM α -ciklodekstrin, napon 30 kV, 20 $^\circ\text{C}$, detekcija pri 237 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 4 s.

Sljedeći pokušaj modifikacije uključuje dodatak 1 % Tritona® u otopinu radnog pufera. Triton®, neionski surfaktant, u kombinaciji s ionskim surfaktantom SDS-om dovodi do stvaranja kombiniranih micela koje, doduše, nisu pomogle u razvoju analitičke metode (Slika 9).



Slika 9. Elektroferogram otopine febeksostata ($50 \mu\text{g/mL}$), DEE-a ($50 \mu\text{g/mL}$), febeksostat etila ($50 \mu\text{g/mL}$), febeksostat amida ($50 \mu\text{g/mL}$; otopljen u DMF/ACN/ H_2O) i pravastatina ($50 \mu\text{g/mL}$) u otapalu ACN: $\text{H}_2\text{O} = 50:50$, v/v.

Uvjeti analize: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 50 mM SDS, 1 % Triton®, napon 30 kV, 20 °C, detekcija pri 237 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 4 s.

Modifikacija uvjeta analize pomoću drugih aditiva pri kojima će se postići simetričniji i bolji oblik pika etilnog onečišćenja bit će predmet daljnjeg istraživanja.

5. ZAKLJUČAK

Tijekom razvoja MEKC metode za analizu febeksostata i njegovih onečišćenja (DEE, amidno i etilno onečišćenje) uz pravastatin kao unutarnji standard, optimizirani su uobičajeni parametri MECK metode (vrsta i pH pufera, napon i temperatura, valna duljina detektora, vrsta i koncentracija surfaktanta) kako bi se osiguralo razdvajanje svih analita u što kraćem vremenu analize.

Optimalni uvjeti analize bili su 20 mM boratni pufer pH 9,3, 50 mM SDS, primijenjeni napon 30 kV, 20°C, detekcija pri 237 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 4 s. Omogućeno je razdvajanje analita unutar 2 minute uz prisutnost α -ciklodekstrina ili unutar 6 minuta bez α -ciklodekstrina. Osigurati topljivost amidnog onečišćenja je bilo zahtjevno, a većina ispitanih otapala je značajno utjecala na rezultate analize. Nadalje, ispitan je dodatak različitih aditiva (α -ciklodekstrin (10 – 15 mM) i 1% Triton, neionski surfaktant) s ciljem postizanja simetričnog pika etilnog onečišćenja. Modifikacija uvjeta analize pomoću drugih aditiva pri kojima će se postići bolji i simetričniji oblik pika etilnog onečišćenja bit će predmet daljnjeg istraživanja.

Budući da je analiza onečišćenja sastavni dio svakodnevne industrijske proizvodnje lijekova, nužno je razviti što više pouzdanih, točnih i preciznih metoda koje će omogućiti kratkotrajne analize koje su precizne i ekološki prihvatljive.

6. LITERATURA

1. Guideline for Elemental Impurities, 2014, International Conference on Harmonisation, Q3D
2. Impurities in New Drug Products, 2006b, International Conference on Harmonisation, Q3B(R2)
3. Impurities: Guideline for Residual Solvents, 2011, International Conference on Harmonisation, Q3C(R5)
4. Impurities in New Drug Substances, 2006a, International Conference on Harmonisation, Q3A(R2)
5. Mornar A, Nigović B, Sertić M. Simultana analiza statina kapilarnom elektroforezom u farmaceutskim proizvodima. U: Analitika u razvoju farmaceutskih proizvoda - praktikum, Farmaceutsko - biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za analitiku i kontrolu lijekova, Zagreb, 2013, str. 5-12.
6. Nigović B. Kapilarna elektroforeza. U: Analitika lijekova. Zagreb, 2014.
7. Nigović B. Onečišćenja u lijekovima. U: Analitika lijekova. Zagreb, 2014.
8. Nigović B, Sertić M. Onečišćenja u lijekovima. *Farm Glas* 68, 2012, 77-88.
9. Nigović B, Vegar I. Capillary Electrophoresis Determination of Pravastatin and Separation of Its Degradation Products. *Croat Chem acta*, Zagreb, 2008.
10. Sažetak opisa svojstava lijeka (Adrenuric), 2012, <http://www.almp.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-11-01-286.pdf>, pristupljeno 03. 04. 2016.
11. Sertić M. Nove kapilarno elektroforetske i kromatografske metode u analitici statina, Doktorska disertacija, Zagreb, 2013.
12. Smolčić I. Promjene u ispitivanju metalnih onečišćenja u kontroli kakvoće lijekova. Specijalistički rad, Zagreb, 2015.
13. Terabe S. Micellar Electrokinetic Chromatography. Hyogo, Beckman, 1992, str. 27-35.
14. Watson D. Pharmaceutical analysis. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1999, str. 293. - 311.

7. SAŽETAK / SUMMERY

Analiza onečišćenja sastavni je dio kontrole kakvoće lijekova zbog čega je nužan razvoj jednostavnih i selektivnih analitičkih metoda za analizu potencijalnih onečišćenja. Febuksostat je novi lijek za giht koji se u kliničkim istraživanjima pokazao znatno učinkovitijim u snižavanju razine mokraćne kiseline u serumu u odnosu na liječenje uobičajeno korištenim dozama alopurinola.

Za analizu febuksostata i njegovih onečišćenja (DEE, amidno i etilno onečišćenje), uz pravastatin kao unutarnji standard, odabrana je micelarna elektrokinetička kromatografija zbog kratkog vremena analize i ekološke prihvatljivosti. Tijekom razvoja MEKC metode optimizirani su uobičajeni parametri MECK metode (vrsta i pH pufera, napon i temperatura, valna duljina detektora, vrsta i koncentracija surfaktanta) kako bi se osiguralo razdvajanje svih analita u što kraćem vremenu analize.

Optimalni uvjeti analize bili su 20 mM boratni pufer pH 9,3, 50 mM SDS, primijenjeni napon 30 kV, 20°C, detekcija pri 237 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 4 s. Pri ovim uvjetima omogućeno je razdvajanje analita unutar 2 minute uz prisutnost α -ciklodekstrina ili unutar 6 minuta bez α -ciklodekstrina. Osigurati topljivost amidnog onečišćenja je bilo zahtjevno, a većina ispitanih otapala je značajno utjecala na rezultate analize. Nadalje, ispitan je dodatak različitih aditiva (α -ciklodekstrin (10 – 15 mM) i 1% Triton, neionski surfaktant) s ciljem postizanja simetričnog pika etilnog onečišćenja. Modifikacija uvjeta analize pomoću drugih aditiva pri kojima bi se postigao bolji oblik i simetričan pik etilnog onečišćenja bit će predmet daljnjeg istraživanja.

Budući da je analiza onečišćenja sastavni dio svakodnevne industrijske proizvodnje lijekova, nužno je razviti što više pouzdanih, točnih i preciznih metoda koje će omogućiti kratkotrajne analize koje ujedno i ekološki prihvatljive.

Ključne riječi: micelarna elektrokinetička kromatografija, febuksostat, onečišćenja

Impurity analysis is an integral part of the quality control of medicines. Therefore, development of simple and selective methods for monitoring impurities is highly required. Febuxostat is a new drug for gout. In clinical research, it was shown that febuxostat reduces amount of blood uric acid levels much better than standard doses of allopurinol.

Micellar electrokinetic chromatographic approach was chosen to develop a method able to separate a febuxostat and its impurities (DEE, ethyl, amide) with pravastatin as internal standard because of the short time analysis and environmental safety. During the development of MECK method, the most usual parameters were optimized (pH and buffer type, voltage and temperature, detector wavelength, the type and concentration of surfactant) to ensure separation of all analytes in the shortest analysis time.

The optimum conditions of analysis were 20 mM borate buffer pH 9.3, 50 mM SDS, applied voltage is 30 kV, 20°C, detection at 237 nm, hydrodynamic injection of 50 mbar, 4 s. Under these conditions the separation was successful within 2 minutes in the presence of α -cyclodextrin or within 6 minutes without α -cyclodextrin. To ensure solubility of amide was demanding, a majority of tested solvents significantly affected the results of the analysis. Furthermore, the addition of various additives was examined (α -cyclodextrin (10 - 15 mM) and 1% Triton, non-ionic surfactant) in order to achieve a symmetrical ethyl peak. Modification of the conditions of analysis with other additives to achieve better and symmetrical shape will be the subject of further research.

Since the analysis of impurities is integral part of industrial production of drugs, it is necessary to develop a more reliable, accurate and precise method that would allow short-term analysis which are also environmentally friendly.

Keywords: micellar electrokinetic chromatography, febuxostat, impurities

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za Analitiku i kontrolu lijekova
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

RAZVOJ NOVE KAPILARNOELEKTROFORETSKE METODE ZA ANALIZU FEBUKSOSTATA I NJEGOVIH ONEČIŠĆENJA

Marina Galović

SAŽETAK

Analiza onečišćenja sastavni je dio kontrole kakvoće lijekova zbog čega je nužan razvoj jednostavnih i selektivnih analitičkih metoda za analizu potencijalnih onečišćenja. Febuksostat je novi lijek za giht koji se u kliničkim istraživanjima pokazao znatno učinkovitijim u snižavanju razine mokraćne kiseline u serumu u odnosu na liječenje uobičajeno korištenim dozama alopurinola.

Za analizu febuksostata i njegovih onečišćenja (DEE, amidno i etilno onečišćenje), uz pravastatin kao unutarnji standard, odabrana je micelarna elektrokinetička kromatografija zbog kratkog vremena analize i ekološke prihvatljivosti. Tijekom razvoja MEKC metode optimizirani su uobičajeni parametri MECK metode (vrsta i pH pufera, napon i temperatura, valna duljina detektora, vrsta i koncentracija surfaktanta) kako bi se osiguralo razdvajanje svih analita u što kraćem vremenu analize.

Optimalni uvjeti analize bili su 20 mM boratni pufer pH 9,3, 50 mM SDS, primijenjeni napon 30 kV, 20°C, detekcija pri 237 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 4 s. Pri ovim uvjetima omogućeno je razdvajanje analita unutar 2 minute uz prisutnost α -ciklodekstrina ili unutar 6 minuta bez α -ciklodekstrina. Osigurati topljivost amidnog onečišćenja je bilo zahtjevno, a većina ispitanih otapala je značajno utjecala na rezultate analize. Nadalje, ispitan je dodatak različitih aditiva (α -ciklodekstrin (10 – 15 mM) i 1% Triton, neionski surfaktant) s ciljem postizanja simetričnog pika etilnog onečišćenja. Modifikacija uvjeta analize pomoću drugih aditiva pri kojima bi se postigao bolji oblik i simetričan pik etilnog onečišćenja bit će predmet daljnjeg istraživanja.

Budući da je analiza onečišćenja sastavni dio svakodnevne industrijske proizvodnje lijekova, nužno je razviti što više pouzdanih, točnih i preciznih metoda koje će omogućiti kratkotrajne analize koje ujedno i ekološki prihvatljive.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 26 stranica, 9 grafičkih prikaza, 7 tablica i 14 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: micelarna elektrokinetička kromatografija, febuksostat, onečišćenja

Mentor: **Dr. sc. Miranda Sertić**, *docent, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Miranda Sertić**, *docent, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Petra Turčić, *docent, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Ana Mornar Turk, *izvanredni profesor, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj, 2016.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Pharmaceutical Analysis
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

DEVELOPMENT OF NEW MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY METHOD FOR THE ANALYSIS OF FEBUXOSTAT AND ITS IMPURITIES

Marina Galović

SUMMARY

Impurity analysis is an integral part of the quality control of medicines. Therefore, development of simple and selective methods for monitoring impurities is highly required. Febuxostat is a new drug for gout. In clinical research, it was shown that febuxostat reduces amount of blood uric acid levels much better than standard doses of allopurinol.

Micellar electrokinetic chromatographic approach was chosen to develop a method able to separate a febuxostat and its impurities (DEE, ethyl, amide) with pravastatin as internal standard because of the short time analysis and environmental safety. During the development of MECK method, the most usual parameters were optimized (pH and buffer type, voltage and temperature, detector wavelength, the type and concentration of surfactant) to ensure separation of all analytes in the shortest analysis time.

The optimum conditions of analysis were 20 mM borate buffer pH 9.3, 50 mM SDS, applied voltage is 30 kV, 20°C, detection at 237 nm, hydrodynamic injection of 50 mbar, 4 s. Under these conditions the separation was successful within 2 minutes in the presence of α -cyclodextrin or within 6 minutes without α -cyclodextrin. To ensure solubility of amide was demanding, a majority of tested solvents significantly affected the results of the analysis. Furthermore, the addition of various additives was examined (α -cyclodextrin (10 - 15 mM) and 1% Triton, non-ionic surfactant) in order to achieve a symmetrical ethyl peak. Modification of the conditions of analysis with other additives to achieve better and symmetrical shape will be the subject of further research.

Since the analysis of impurities is integral part of industrial production of drugs, it is necessary to develop a more reliable, accurate and precise method that would allow short-term analysis which are also environmentally friendly.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 26 pages, 9 figures, 7 tables and 14 references. Original is in Croatian language.

Keywords: micellar electrokinetic chromatography, febuxostat, impurities

Mentor: **Miranda Sertić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Miranda Sertić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Petra Turčić, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ana Mornar Turk, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June, 2016.