

ΝΕΩΤΕΡΑ ΠΛΗΡΩΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΣΤΟ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ

Γιώργος Μαχαίρας¹, Άβα Ρόζου², Ειρήνη Παντερή¹

¹ Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης, Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη, Ζωγράφου, Αθήνα. email: irenepanderi@gmail.com

² ELPEN Pharm.Co.Inc., Μαραθώνος 95, Πικέρμι, Αττικής

Περίληψη

Η ροσουβαστατίνη είναι αναστολέας μακράς διάρκειας του ενζύμου αναγωγή του HMG-CoA και χορηγείται για τη θεραπεία της δυσλιπιδαιμίας. Η μετφορμίνη είναι ένα διγουανίδιο που χορηγείται για τη θεραπεία ασθενών με διαβήτη τύπου 2. Η μετφορμίνη μεταξύ άλλων ελαττώνει την ηπατική παραγωγή γλυκόζης και αυξάνει την πρόσληψη της γλυκόζης και τη χρησιμοποίηση της από τους σκελετικούς μύες. Η ροσουβαστατίνη και η μετφορμίνη συχνά χορηγούνται σε συνδιασμό λόγω της συχνής εμφάνισης και των δύο νοσημάτων. Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μέθοδος χρωματογραφικού διαχωρισμού και ποσοτικοποίησης της ροσουβαστατίνης, της μετφορμίνης και των προσμίξεών τους. Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της υδροχρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης σε συνδιασμό με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (HILIC-PDA). Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε αναλυτική στήλη Xbridge® HILIC BEH με ισοκρατική έκλυση και ταχύτητα ροής 0.25 mL min⁻¹. Η μέθοδος επικυρώθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας και του διεθνή Οργανισμού Εναρμόνισης Προδιαγραφών (ICH) για τον έλεγχο των προσμίξεων στις δραστικές ουσίες και τα τελικά προϊόντα.

Λέξεις-Κλειδιά: Ροσουβαστατίνη; Μετφορμίνη; Προσμίξεις; HILIC; Επικύρωση

ABSTRACT

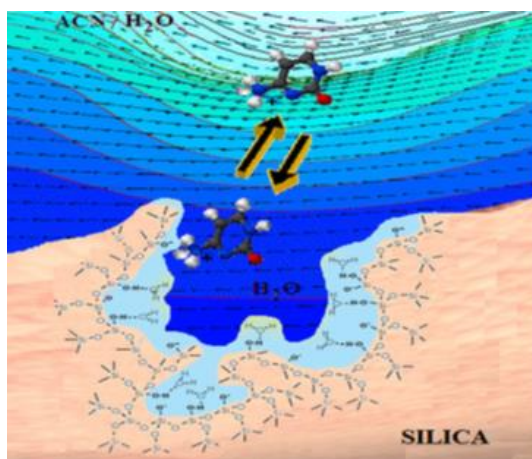
Rosuvastatin administration decreases plasma LDL levels by the inhibition of HMG-CoA reductase and it is indicated for hypercholesterolemia. Metformin is the most widely used antihyperglycemic agent for patients with type 2 diabetes. Rosuvastatin and metformin are frequently prescribed in combination due to the high comorbidity of the two diseases. In this work a hydrophilic interaction liquid chromatographic method coupled with diode array detection was developed and fully validated for the analysis rosuvastatin, metformin and their impurities in pharmaceutical formulations contained both compounds. Separation was performed using an Xbridge® HILIC BEH column operated under isocratic conditions with a flow rate of 0.25 mL min⁻¹. The method was validated according to European Pharmacopoeia and ICH guidelines for impurities and drug products in terms of linearity, sensitivity, precision, accuracy and stability.

Key-Words: Rosuvastatin; Metformin; Impurities; HILIC; Validation

1. Εισαγωγή

Ως πρόσμιξη σε ένα φαρμακευτικό σκεύασμα ορίζεται σύμφωνα με το Διεθνή Οργανισμό Εναρμόνισης Προδιαγραφών (International Conference on Harmonisation of Guidelines) ένα οποιοδήποτε συστατικό το οποίο δεν ορίζεται με χημική ταυτότητα στη φαρμακευτική ουσία. Η ασφάλεια ενός φαρμακευτικού προϊόντος εξαρτάται όχι μόνο από τις τοξικολογικές ιδιότητες της δραστικής ουσίας αλλά και από τις προσμίξεις που αυτό περιέχει. Ως εκ τούτου η ανίχνευση, η ποσοτικοποίηση και ο έλεγχος των προσμίξεων ενός φαρμακευτικού προϊόντος είναι ένα πολύ σημαντικό μέρος της ανάπτυξης του προϊόντος και της εναρμόνισης του με τις απαιτήσεις της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποίας και τους διεθνείς κανονισμούς.

Η υδροχρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης HILIC αποτελεί μία σχετικά νέα τεχνική ανάλυσης η οποία τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει να χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό προσμίξεων από τις δραστικές ενώσεις. Βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στο διαχωρισμό πολικών ουσιών οι οποίες εμφανίζουν μικρή ή και ελάχιστη κατακράτηση στις ευρύτερα διαδεδομένες στήλες αντίστροφης φάσης. Αν και η συγκεκριμένη τεχνική υπήρχε από τις αρχές της δεκαετίας του '90 με νέες στατικές φάσεις συνεχώς να ανακαλύπτονται, η σπουδαιότητα της άρχισε να αναγνωρίζεται τα τελευταία χρόνια, κυρίως εξαιτίας της ανάγκης να αναλύονται ικανοποιητικά πολικές ουσίες σε εξαιρετικά πολύπλοκα δείγματα. Οι νέες επιστημονικές εργασίες υποστηρίζουν πως μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στις περισσότερες κατηγορίες πολικών συστατικών ιοντισμένων και μη. Οι στατικές φάσεις HILIC είναι υδρόφιλες και σε αντίθεση με άλλες χρωματογραφικές τεχνικές, μέρος της κινητής φάσης δρα ως αναπόσπαστο κομμάτι της στατικής φάσης καθώς σχηματίζει μια υδατική ψευδο-στιβάδα που επικαλύπτει τη στατική φάση. Επομένως θεωρείται κρίσιμο η συγκέντρωση του νερού στην κινητή φάση να διατηρείται σε συγκεκριμένα όρια (περίπου 3-60%). Οι αναλύτες αλληλεπιδρούν με τη στατική φάση και συνεπώς όσο πιο υδρόφιλος είναι ένας αναλύτης, τόσο ισχυρότερα κατακρατείται (σχήμα 1).



Σχήμα 1: Υδατική ψευδο-στιβάδα που επικαλύπτει στατική φάση HILIC πηκτής πυριτίας

Τα άλατα που χρησιμοποιούνται κυρίως, λόγω της ισχυρής διαλυτοποίησής τους στο νερό, είναι το οξικό αμμώνιο και το μυρμηκικό αμμώνιο. Για τους περισσότερους αναλύτες συγκεντρώσεις ρυθμιστικού διαλύματος σε εύρος 5 έως 20mM είναι επαρκείς με ανώτατο όριο τα 200 έως 300mM ανάλογα με τη διαλυτότητα των αλάτων

στην κινητή φάση. Η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος πρέπει να επιλέγεται με προσοχή, ώστε να μην παρεμποδίζει τη διαδικασία της ανίχνευσης. Οι αρνητικά ή θετικά φορτισμένοι αναλύτες τυπικά απαιτούν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ρυθμιστικού διαλύματος από τις ουδέτερες ενώσεις ή τους αμφολύτες. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του άλατος, τόσο περισσότερο μειώνονται οι ιοντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αναλυτών και της στατικής φάσης, αλλά ταυτόχρονα τόσο αυξάνεται το πάχος της υδατικής στιβάδας με αποτέλεσμα την αύξηση της κατακράτησης των αναλυτών. Διάφοροι πολικοί, ευδιάλυτοι στο νερό οργανικοί διαλύτες είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν στη HILIC, ωστόσο το ακετονιτρίλιο αποτελεί μέχρι σήμερα την πρώτη επιλογή καθώς διαλύει τους περισσότερους αναλύτες και προσφέρει ικανοποιητική συγκράτηση. Ως ισχυρός εκλουστικός παράγοντας μπορεί να χρησιμοποιηθεί νερό ή μεθανόλη με το νερό να αποτελεί τη συνηθέστερη επιλογή.

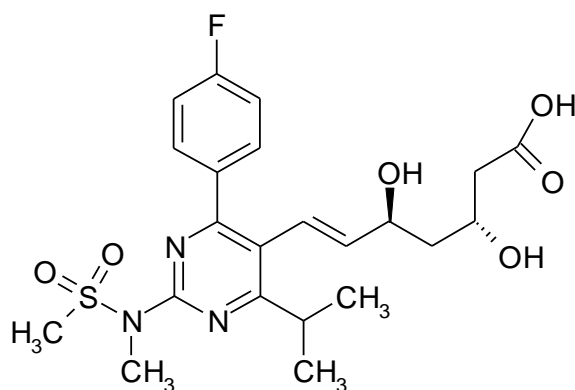
Η παρούσα εργασία έχει ως στόχο την ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου χρωματογραφικού διαχωρισμού και ποσοτικοποίησης της ροσουβαστατίνης, της μετφομίνης και των προσμίξεών τους σε δισκία με την τεχνική της υγροχρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης σε συνδιασμό με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (HILIC-PDA). Η δυσκολία της ανάπτυξης της μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των δύο φαρμακευτικών ενώσεων και των προσμίξεων τους σε ένα σκεύασμα έγκειται στη μεγάλη διαφορά στην αναλογία των δύο δραστικών ουσιών στο σκεύασμα σε συνδιασμό με τις απαιτήσεις της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας για χαμηλά όρια ποσοτικοποίησης στις προσμίξεις. Έπρεπε επομένως να βρεθεί κατάλληλη μέθοδος προεργασίας δείγματος και κατάλληλο χρωματογραφικό σύστημα που θα επέτρεπε το διαχωρισμό και την ανίχνευση των προσμίξεων σε ικανοποιητικά επίπεδα συγκεντρώσεων. Η χρωματογραφία HILIC δίνει τη δυνατότητα ισοκρατικής έκλουσης των αναλυτών σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα, ενώ η χρήση στήλης μικρής διαμέτρου βελτιώνει σημαντικά τα όρια ποσοτικοποίησης των προσμίξεων.

2. Μεθοδολογία

Οι ουσίες που αναλύθηκαν και οι προσμίξεις τους είναι αναλυτικά οι εξής:

2.1 Ροσουβαστατίνη

Η ροσουβαστατίνη (σχήμα 2) χορηγείται σε ασθενείς που πάσχουν από υπερχοληστερολεμία και δυσλιπιδαιμία για την ελάττωση των υψηλών επιπέδων λιπιδίων στον οργανισμό. Η ροσουβαστατίνη ανήκει στις στατίνες και είναι αναστολέας μακράς διάρκειας του ενζύμου αναγωγή του HMG-CoA. Το ένζυμο αυτό καταλύει τη μετατροπή του HMG-CoA σε μεβαλονικό οξύ. Η επακόλουθη μείωση της ηπατικής σύνθεσης χοληστερόλης οδηγεί σε αυξημένη σύνθεση των υποδοχέων της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL), αυξάνοντας την κάθαρση της LDL από το πλάσμα στα ηπατικά κύτταρα. Επομένως η κύρια βιοχημική επίδραση της χορήγησης ροσουβαστατίνης είναι η ελάττωση της LDL στο πλάσμα. Υπάρχει επίσης κάποια μείωση στα τριγλυκερίδια του πλάσματος και αύξηση στην λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (HDL).



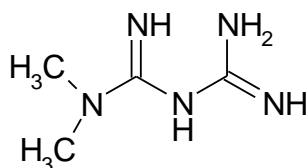
Σχήμα 2: Χημική δομή της ροσουβαστατίνης

Οι γνωστές προσμίξεις της ροσουβαστατίνης που θα αναλυθούν στην παρούσα εργασία είναι οι εξής:

- Πρόσμιξη Β: (3*RS*,5*RS*,6*E*)-7-[4-(4-fluorophenyl)-6-(1-methyl-ethyl)2-[methyl(methylsulfonyl)amino] pyrimidin-5-yl]-3,5-dihydroxyhept-6-enoate
- Πρόσμιξη Γ: (3*R*,6*E*)-7-[4-(4-fluorophenyl)-6-(1-methyl-ethyl)2-[methyl(methylsulfonyl)amino]pyrimidin-5-yl]-3,5-dihydroxyhept-6-enoate
- Πρόσμιξη Δ: N-[4-(4-fluorophenyl)-5-[ε-2-[(2*S*,4*R*)-4-hydroxy-6-oxotetrahydro-2*H*-pyran-2-yl]ethenyl]-6-(1-methylethyl)-pyrimidin [2-yl]-N-methylmethanesulfonamide

2.2 Μετοφορμίνη

Η μετοφορμίνη (σχήμα 3), είναι ένα διγουανίδιο που μειώνει την υπεργλυκαιμία καταστέλοντας την παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ. Το φάρμακο χορηγείται σε άτομα που πάσχουν από διαβήτη τύπου II, στα οποία ο ρυθμός της γλυκονεογένεσης είναι τρεις φορές μεγαλύτερος από το φυσιολογικό και η μετοφορμίνη μειώνει τη διαδικασία αυτή σε μεγάλο βαθμό.



Σχήμα 3: Χημική δομή της μετοφορμίνης

Οι γνωστές προσμίξεις της Μετοφορμίνης οι οποίες θα αναλυθούν είναι οι εξής:

- Πρόσμιξη Α: cyanoguanidine
- Πρόσμιξη Β: 4,6-diamino-1,3,5-triazin-2-yl)guanidine
- Πρόσμιξη Γ: *N,N*-dimethyl-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine
- Πρόσμιξη Δ: 1,3,5-triazine-2,4,6-triamine
- Πρόσμιξη Ε: 1-methylbiguanide

2.3 Οργανολογία

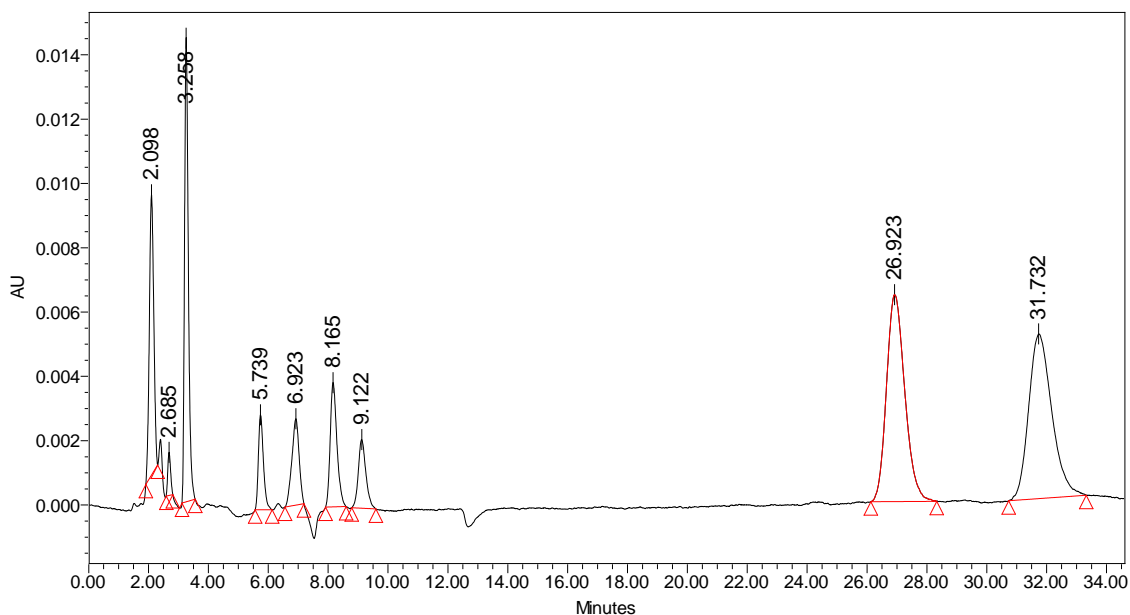
Το σύστημα υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από αντλία ισοκρατικής έκλουσης Waters 1515 με θερμοστάτηση της στήλης, αυτόματο δειγματολήπτη Waters 717 plus και ανιχνευτή σειράς φωτοδιόδων Waters 996 PDA. Η επεξεργασία και η ανάλυση των χρωματογραφικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα Empower της εταιρίας Waters. Όλοι οι αναλύτες ανιχνεύονται σε εύρος μηκών κύματος 200-350nm και τα χρωματογραφήματα εξάγονται στο αντίστοιχο μέγιστο μήκος κύματος, λ_{max} , της κάθε δραστικής.

2.4 Βελτιστοποίηση της μεθόδου

Οι δύο δραστικές ουσίες και οι προσμίξεις τους είναι μόρια μέτριας και υψηλής πολικότητας, συνεπώς η HILIC αποτελεί ιδανική μέθοδος ανάλυσης. Στο στάδιο αυτό έγινε επιλογή των κατάλληλων συνθηκών για την ανάλυση των δραστικών φαρμακευτικών ενώσεων και των προσμίξεών τους λαμβάνοντας υπόψη πληροφορίες ως προς τον ιοντισμό και τη λιποφιλία τους με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος ADME Boxes ver. 3. Λόγω του μεγάλου αριθμού των αναλυτών, υπάρχει ποικιλία ως προς τον ιοντισμό και τη λιποφιλία τους. Η χρωματογραφική συμπεριφορά τους μελετήθηκε σε μια σειρά από αναλυτικές στήλες HILIC. Κατά τη διαδικασία της ανάπτυξης της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκε τόσο οξικό όσο και μυρμηκικό αμμώνιο ως άλας στην κινητή φάση, ενώ χρησιμοποιήθηκε νερό και μεθανόλη ως ισχυρός τροποποιητής. Η αναλυτική στήλη που τελικά επιλέχθηκε ήταν η XBridge® BEH HILIC 2,1x150mm με μέγεθος σωματιδίων 3,5 μ m. Η κινητή φάση αποτελείται από μίγμα που περιέχει υψηλό ακετονιτριλίου με μικρό ποσοστό νερού παρουσία άλατος και κατάλληλη ρύθμιση της τιμής του pH της υδατικής φάσης. Η ταχύτητα ροής ήταν ρυθμισμένη στα 0,25 mL min⁻¹, ενώ οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε ελεγχόμενη θερμοκρασία.

Αναπτύχθηκε η κατάλληλη μέθοδος κατεργασίας δείγματος ώστε να μην υπάρχει παρεμπόδιση από τη μετφορμίνη η οποία βρίσκεται σε πολύ μεγαλύτερη αναλογία στα δισκία.

Στο σχήμα 4 παρουσιάζεται τυπικό χρωματογράφημα ροσουβαστατίνης, μετφορμίνης και των προσμίξεών τους σε συγκέντρωση 1 μ g/mL που λαμβάνεται σύμφωνα με τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες.



Σχήμα 4: Τυπικό χρωματογράφημα ροσουβαστατίνης, μετφορμίνης και των προσιμίων τους σε συγκέντρωση 1 μg/mL με χρωματογραφία HILIC

2.5 Μελέτες Σταθερότητας

Πραγματοποιήθηκαν μελέτες επιταχυνόμενης διάσπασης με κατεργασία της κάθε δραστικής σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας. Στη μελέτη αποικοδόμησης μελετήθηκε αρχικά η επίδραση των εξής συνθηκών αποθήκευσης: όξινο περιβάλλον με HCl, βασικό περιβάλλον με NaOH, οξειδωση με H₂O₂, υδρόλυση με νερό στους 65 °C σε υδατόλουτρο. Επίσης δείγματα της κάθε δραστικής υπόκεινται σε θέρμανση στους 65 °C, υπό την επίδραση UV λάμπας στα 254 nm για 24 ώρες και την επίδραση φωτός για 24 ώρες. Πραγματοποιείται σύγκριση των διαλυμάτων με διάλυμα το οποίο δεν έχει υποβληθεί σε επιταχυνόμενη διάσπαση, με σκοπό τη σύγκριση της απώλειας ανάκτησης σε σχέση με τις υποβαλλόμενες συνθήκες διάσπασης.

2.6 Επικύρωση

Η μεθοδολογία αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας, γραμμικότητα, ορθότητα, πιστότητα, όριο ανίχνευσης, όριο ποσοτικοποίησης και ανάκτηση. Για τον προσδιορισμό των προσιμίων η περιοχή εργασίας για τις καμπύλες βαθμονόμησης επιλέχθηκε να είναι από το επίπεδο ελέγχου της πρόσμιξης έως 120% της προδιαγραφής. Η μέθοδος εφαρμόστηκε στην ανάλυση πιλοτικών δισκίων τα οποία περιέχουν και τις δύο δραστικές.

3. Συμπεράσματα

Η χρωματογραφία HILIC μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην ανάλυση πολικών αναλυτών σε πολύπλοκα μίγματα και στο διαχωρισμό ενώσεων με παραπλήσια χημική δομή. Η αναπτυχθείσα μέθοδος HILIC-PDA επιτρέπει το χρωματογραφικό διαχωρισμό 11 αναλυτών, ορισμένοι από τους οποίους μοιάζουν

δομικά μεταξύ τους, με ισοκρατική έκκλιση σε χρόνο μικρότερο από 30 λεπτά με ταχύτητα ροής 0,25 mL min⁻¹, με τη χρήση μικρο-στήλης.

Βιβλιογραφία

1. Singh S., Handa T., Narayanam M., Sahu A., Junwal M., Shah R.P., “A critical review on the use of modern sophisticated hyphenated tools in the characterization of impurities and degradation products”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 69 pp. 148-173, 2012
2. Macwan J.S., Ionita I.A., Akhlaghi F., “A simple assay for the simultaneous determination of rosuvastatin acid, rosuvastatin-5S-lactone, and N-desmethyl rosuvastatin in human plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402, pp. 1217-1227, 2012
3. Ismail Mohamed A.M., Abdel-Fattah Mohamed F., Ahmed S., Salim Mohamed Y.A., “An efficient hydrophilic interaction liquid chromatographic method for the simultaneous determination of metformin and pioglitazone using high-purity silica column”, *Journal of Chromatography B*, 997 PP. 16-22, 2015
4. Yegorova A.V., Fedosenko G.A., Scrypynetsa Yu.V., Leonenko I.I., Maltsevb G.V., and Antonovicha V.P., “Determination of Residual Amounts of Rosuvastatin Calcium on the Surfaces of Pharmaceutical Equipment by HPLC and Luminescence”, *Journal of Analytical Chemistry*, 71, pp. 126-132, 2016
5. Dejaegher B., Heyden Y.V., “HILIC methods in pharmaceutical analysis”, *Journal of Separation Science* 33, pp. 698-715, 2010
6. Hemstrom P., Irgum K., “Hydrophilic interaction chromatography”, *Journal of Separation Science* 29, pp. 1784-1821, 2006
7. Singh S., Junwal M., Modhe G., Tiwari H., Kurmi M., Parashar N., Sidduri P., “Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products”, *Trends in Analytical chemistry*, 49, pp. 71-88, 2013
8. Lee D., Roh H., Son H., Jang S.B., Lee S., Nam S.Y., Park K., “Pharmacokinetic interaction between rosuvastatin and metformin in healthy Korean male volunteers: A randomized, open-label, 3-period, crossover, multiple-dose study” *Clinical Therapeutics*, 36, pp. 1171-1181, 2014