ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ HILIC-PDA ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΡΙΣΕΔΡΟΝΑΤΗΣ ΣΕ ΔΙΣΚΙΑ

Ευγενία Ταξιάρχη, Δήμητρα Κυριακίδου και Ειρήνη Παντερή
Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης, Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
email: irenepanderi@gmail.com

Περίληψη
Η νατριούχος ρισεδρονάτη, είναι το νατριούχο άλας του 1-υδροξυ-2-[3-πυριδινυλο] αιθυλιδενο διφωσφονικού οξέος και ανήκει στην κατηγορία των διφωσφονικών φαρμάκων. Τα διφωσφονικά φάρμακα είναι συνθετικά ανάλογα του πυροφωσφορικού οξέος, με τη διαφορά ότι στην αλυσίδα P-O-P το άτομο του οξυγόνου έχει αντικατασταθεί με ένα άτομο άνθρακα (P-C-P) προσθέτοντας δύο πλευρικές αλυσίδες στο άτομο του άνθρακα. Η βιολογική τους δράση είναι διπλή: τα διφωσφονικά φάρμακα αναστέλλουν την επασβέστωση των οστών, εμποδίζοντας την επιδιόρθωση τους και παράλληλα αναστέλλουν την επαναρρόφηση τους, δηλαδή επιβραδύνουν την αποικοδόμηση τους. Τα διφωσφονικά είναι αρκετά πολικές ενώσεις, οι οποίες με τη χρήση υγροχρωματογραφίας αντίστροφης φάσης εκλούονται στο νεκρό χρόνο. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα περισσότερα διφωσφονικά στερούνται χρωμοφόρας ομάδας και για το λόγο αυτό απαιτείται παραγωγοποίηση τους με κατάλληλα αντιδραστήρια ώστε να αναλυθούν με χρωματογραφικές μεθόδους. Η νατριούχος ρισεδρονάτη, είναι ένα πυριδινυλο διφωσφονικό άλας που χορηγείται κατά της οστοπόρωσης, σε γυναίκες με μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση, κατά της νόσου του Paget και σε άλλες σκελετικές ανωμαλίες.
Στην εργασία αναπτύσσεται και επικυρώνεται μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της ρισεδρονάτης σε δισκία με την τεχνική της υγροχρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης σε συνδιασμό με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (HILIC-PDA). Μελετήθηκε η χρωματογραφική συμπεριφορά της ρισεδρονάτης και άλλων διφοσφωνικών με υγροχρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC). Αξίζει να σημειωθεί ότι η HILIC είναι μια σχετικά νέα τεχνική με αρκετό ενδιαφέρον και αποτελεί ιδανική επιλογή για την ανάλυση πολικών, υδρόφιλων ενώσεων που αδυνατούν να προσδιοριστούν με τις στήλες της υγροχρωματογραφίας αντίστροφης φάσης. Για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου HILIC, δοκιμάστηκαν διαφορετικές χρωματογραφικές στήλες και διαφορετικές κινητές φάσεις, στις οποίες μεταβαλλόταν το pH, το είδους του ρυθμιστικού άλατος, η συγκέντρωσή του και το ποσοστό του οργανικού τροποποιητή. Ακολούθως αναπτύχθηκε μέθοδος κατεργασίας των δισκίων ρισεδρονάτης και η μέθοδος επικυρώθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητάς της (γραμμικότητα, ορθότητα, πιστότητα, όριο ανίχνευσης, όριο ποσοτικοποίησης, ανθεκτικότητας) και εφαρμόστηκε στην ανάλυση δισκίων ρισεδρονάτης που κυκλοφορούν στην ελληνική αγορά.

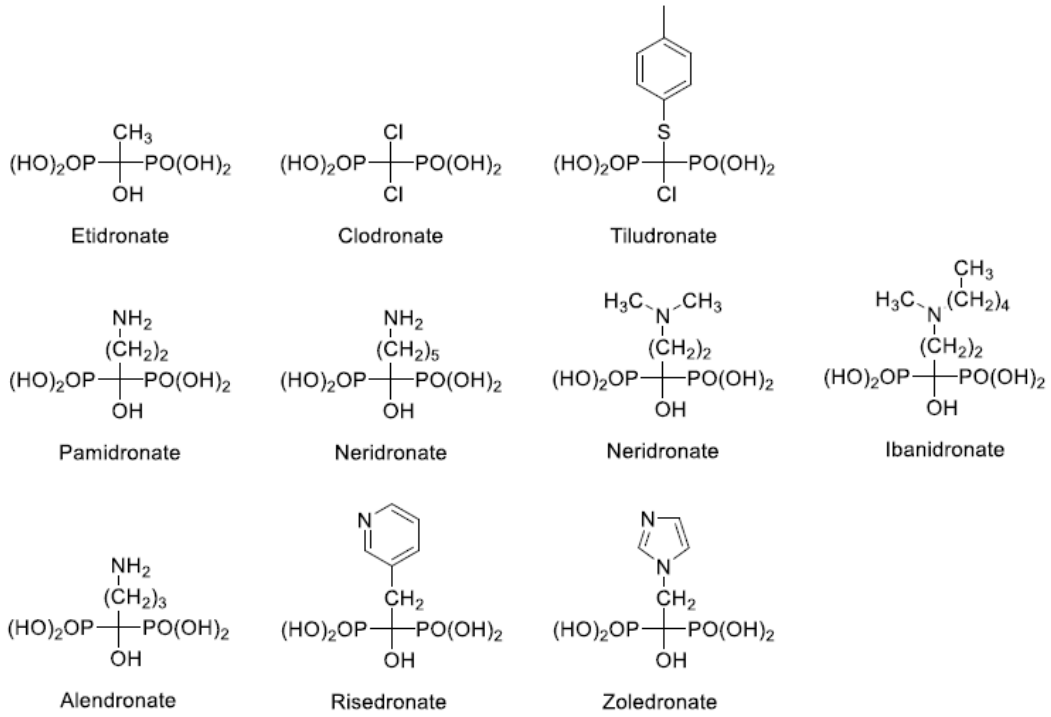
Λέξεις-Κλειδιά: *Ρισεδρονάτη, HILIC, PDA, ποσοτικός προσδιορισμός, δισκία.*

Abstract
Risedronate sodium (1-hydroxy-2-(3-pyridinyl) ethylidene bisphosphonic acid monosodium salt), is a pyridinyl bisphosphonate that is used in the treatment of skeletal disorders as it modulates bone metabolism by the inhibition of osteoclast-mediated bone resorption. Risedronate along with other aromatic nitrogencontaining biphosphonates inhibits the activity the enzyme farnesyl pyrophosphate synthase (FPPS) which is involved in the mevalonate pathway. It reduces the risk of vertebral fracture and prevents nonvertebral osteoporosisrelated fractures in postmenopausal osteoporotic women and it is also effective in the treatment of Paget's disease and other skeletal disorders. Biphosphonates are quite polar compounds, which by using reversed phase liquid chromatography are eluted very close to the solvent front.
In this work a hydrophilic interaction liquid chromatographic method coupled with diode array detection was developed and fully valitaded for the analysis of risedronate in pharmaceutical products. HILIC chromatography is a relatively new and promising technique for analysis and separation of polar substances which show little or minimal retention in the widely used reversed phase columns. As the elution order in HILIC is reversed to RP-HPLC a reasonable retention and selectivity for polar compounds is expected. Chromatographic conditions were optimized to achieve adequate retention of the parent drug and separation from tablets excipients. Various combinations of acetonitrile (organic modifier) and aqueous buffer solutions with changed content of each component were thoroughly investigated to identify the optimal mobile phase composition. The method was fully validated according to ICH guidelines. The proposed method is applicable as well for routine analysis and content uniformity test of risedronate in tablets and complies well with the validation requirements in the pharmaceutical industry.

Key-Words: *Risedronate, HILIC, PDA, quantitation, tablets*

1. Εισαγωγή

Τα διφωσφονικά φάρμακα αποτελούν μεταβολικά σταθερά βιοϊσοστερή του ανόργανου πυροφωσφορικού , Drake (2008). Το πυροφωσφορικό ανιόν απελευθερώνεται ως παραπροϊόν πολλών βιοχημικών αντιδράσεων του οργανισμού και τα επίπεδά του έχουν συσχετιστεί με τον μηχανισμό της οστικής επασβέστωσης, λόγω της ικανότητάς του να δεσμεύει ισχυρά κρυστάλλους υδροξυαπατίτη, του κυριότερου δομικού συστατικού των οστών. Τα διφωσφονικά φάρμακα ως βιοϊοσοστερή του πυροφωσφορικού, έχουν επίσης μεγάλη συγγένεια προς τα οστά και ενσωματώνονται σε αυτά και ιδίως σε περιοχές του σκελετού όπου επιτελείται έντονα οστική ανάπλαση. Η βιολογική τους δράση αποσκοπεί στην αναστολή της απασβέστωσης των οστών εμποδίζοντας την επιδιόρθωση τους. Όπως είναι εμφανές από τη χημική δομή τους, τα διφωσφονικά χαρακτηρίζονται από την ιδιαίτερη πολικότητά τους. Στην αγορά κυκλοφορούν δέκα διφωσφονικά φάρμακα (σχήμα 1) τα οποία χωρίζονται σε 2 κύριες κατηγορίες, αυτά που δεν περιέχουν άζωτο (πρώτης γενιάς) και αυτά που περιέχουν άζωτο (δεύτερης και τρίτης γενιάς). Τα φάρμακα αυτά χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση παθήσεων που χαρακτηρίζονται από αυξημένη οστική επαναρρόφηση. Η πιο κοινή πάθηση για την καταπολέμηση της οποίας χρησιμοποιούνται τα διφωσφονικά είναι η οστεοπόρωση. Μία ακόμη πάθηση που καταπολεμάται με διφωσφονικά φάρμακα και μάλιστα η πρώτη για την οποία εγκρίθηκε η χρήση τους από τον FDA είναι η νόσος του Paget, μία ασθένεια μεταβολισμού των οστών.



Σχήμα 1: Δομές διφωσφονικών φαρμάκων

Η υγροχρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης HILIC βρίσκει εφαρμογή στο διαχωρισμό πολικών ουσιών οι οποίες παρουσιάζουν μικρή ή ελάχιστη συγκράτηση στις στήλες αντίστροφης φάσης Hemstrom (2006). Η HILIC είναι μια τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις περισσότερες κατηγορίες πολικών συστατικών Dejaegher (2008). Επικρατεί ένας μικτός μηχανισμός συγκράτησης που περιλαμβάνει φαινόμενα κατανομής, προσρόφησης, ιοντικής και υδρόφοβης αλληλεπίδρασης. Οι στατικές φάσεις στη χρωματογραφία HILIC είναι υδρόφιλες και μέρος της κινητής φάσης δρα ως αναπόσπαστο κομμάτι της στατικής φάσης καθώς σχηματίζει μια υδατική ψευδοστιβάδα που επικαλύπτει τη στατική φάση. Για τι λόγο αυτό 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.

Διάφοροι πολικοί, ευδιάλυτοι στο νερό οργανικοί διαλύτες είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν στην υγροχρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης, 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. Τα άλατα που χρησιμοποιούνται κυρίως, λόγω της ισχυρής διαλυτοποίησης τους στο νερό, είναι το οξικό αμμώνιο και το μυρμηκικό αμμώνιο. Για τους περισσότερους αναλύτες συγκεντρώσεις ρυθμιστικού διαλύματος σε εύρος 5 έως 20 mM είναι επαρκείς με ανώτατο όριο τα 200 έως 300 mM 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.

Η παρούσα εργασία έχει ως στόχο την ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου χρωματογραφικού διαχωρισμού και ποσοτικοποίησης της ρισεδρονάτης σε δισκία με την τεχνική της υγροχρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης σε συνδυασμό με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (HILIC-PDA). Η δυσκολία ανάπτυξης της μεθόδου έγκειται στη μεγάλη πολικότητα της ρισεδρονάτης και στην ικανότητα της να αλληλεπιδρά με τα μεταλλοϊόντα του χρωματογραφικού συστήματος Kyriakides (2007). Έπρεπε επομένως να βρεθούν οι κατάλληλες χρωματογραφικές συνθήκες που θα επιτρέπουν τον προσδιορισμό και την ανίχνευση της ρισεδρονάτης.

2. Μεθοδολογία

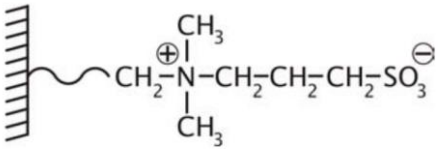
Στο στάδιο αυτό μελετήθηκε η χρωματογραφική συμπεριφορά της ρισεδρονάτης σε στήλη ZIC®p-HILIC, ώστε με μια μέθοδος ανάλυσης να είναι εφικτός ο ποσοτικός προσδιορισμός της ρισεδρονάτης σε δισκία. Οι αρχικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν με την τεχνική της HPLC-UV, όπου καθορίστηκαν οι παράγοντες που συμβάλλουν στο χρωματογραφικό προσδιορισμό της ρισεδρονάτης. Στη συνέχεια ακολούθησε η βελτιστοποίηση των συνθηκών ανίχνευσης της ρισεδρονάτης και η επικύρωση της μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό σε δισκία με την τεχνική HPLC-PDA. Ακόμη, μελετήθηκε η διαδικασία κατεργασίας των δισκίων, έτσι ώστε η ανάκτηση της ρισεδρονάτης να είναι ικανοποιητική και εντός των επιτρεπτών ορίων.

2.1 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. Ο αναλύτης ανιχνεύεται σε μήκος κύματος 262nm και τα χρωματογραφήματα εξάγονται στο αντίστοιχο μέγιστο μήκος κύματος, $\lambda_{max,}$ της δραστικής.

2.2 Βελτιστοποίηση της μεθόδου

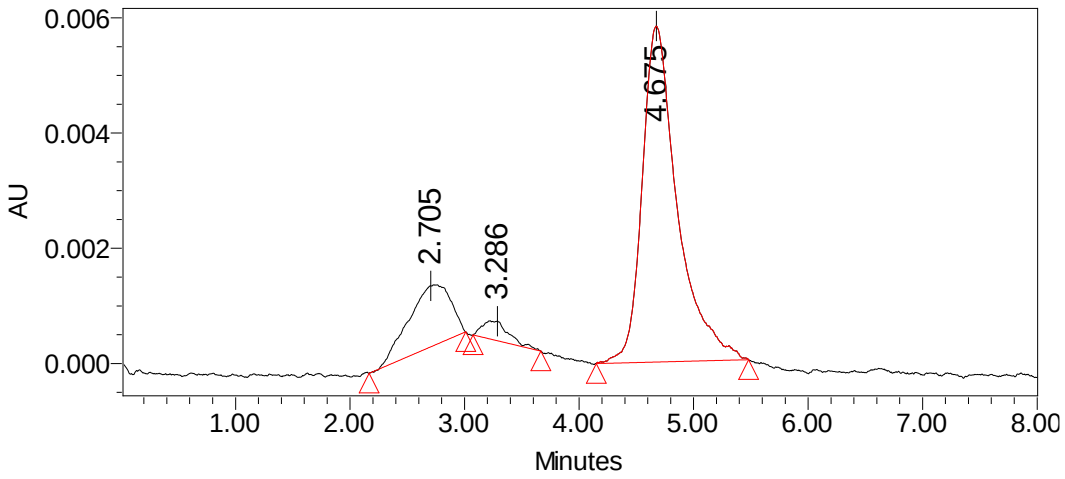
Λόγω της υψηλής πολικότητας της ρισεδρονάτης, η HILIC αποτελεί ιδανική μέθοδο ανάλυσης. Η χρωματογραφική συμπεριφορά του αναλύτη μελετήθηκε σε μια σειρά από αναλυτικές στήλες HILIC και επιλέχθηκε η στήλη ZIC®-pHILIC. Οι στήλες ZIC®-HILIC έχουν ως πληρωτικό υλικό πηκτή πυριτία επικαλυμμένη με στρώμα από ομάδες σουλφοαλκυλοβεταΐνης. Η λειτουργική ομάδα του πληρωτικού υλικού είναι αμφολύτης με το κατιοντικό κέντρο του τεταρτοταγούς αμμωνίου σε αναλογία 1:1 με την αρνητικά φορτισμένη σουλφονική ομάδα (σχήμα 2).



Σχήμα 2: Λειτουργική ομάδα σουλφοαλκυλοβεταΐνης στη στήλη ZIC®-HILIC

Κατά τη διαδικασία ανάπτυξης της μεθόδου, εκτός από την επιλογή της κατάλληλης στήλης, μελετήθηκε και η σύσταση της κινητής φάσης. Ως οργανικός διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το ακετονιτρίλιο, το οποίο αποτελεί την πρώτη επιλογή στη χρωματογραφία HILIC καθώς διαλύει τους περισσότερους αναλύτες και προσφέρει ικανοποιητική συγκράτηση. Ακόμη, το είδος και η συγκέντρωση του ρυθμιστικού

διαλύματος στην κινητή φάση πρέπει να επιλέγεται με προσοχή, ώστε να μην παρεμποδίζεται η διαδικασία της ανίχνευσης του αναλύτη. Η κινητή φάση που τελικά χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από μίγμα ακετονιτριλίου με υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα σε αναλογία 62:38 v/v, η οποία διοχετεύεται στη στήλη με ταχύτητα ροής 0.15 ml min^{-1}. Στο σχήμα 3 παρουσιάζεται τυπικό χρωματογράφημα ρισεδρονάτης σε συγκέντρωση 3,5μg/mL που λαμβάνεται σύμφωνα με τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες.



Σχήμα 3: Τυπικό χρωματογράφημα ρισεδρονάτης σε συγκέντρωση3,5μg/mL με χρωματογραφία HILIC

2.3 Μελέτες Σταθερότητας

Πραγματοποιήθηκε μελέτη αποικοδόμησης όπου μελετήθηκε αρχικά η επίδραση των εξής συνθηκών αποθήκευσης: όξινο περιβάλλον με HCl στους 50 ^{o}C, βασικό περιβάλλον με NaOH στους 25 ^{o}C και οξείδωση με H_2O_2, Singh (2013). 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. Η μέθοδος εφαρμόσθηκε στην ανάλυση δισκίων ρισεδρονάτης τα οποία κυκλοφορούν στην ελληνική αγορά.

3. Συμπεράσματα

Η υγροχρωματογραφία HILIC, είναι το είδος χρωματογραφίας που ενδείκνυται για τέτοιου είδους αναλύσεις με υδρόφιλους αναλύτες, καθώς έτσι λύνονται τα προβλήματα της χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης όπως η μικρή συγκράτησή τους ή η χρήση παραγωγοποιήσης για να αυξηθεί η συγκράτηση τους. Η μέθοδος που προτείνεται περιλαμβάνει μια σχετικά απλή και ταχεία προκατεργασία δείγματος, που σε συνδυασμό με το μικρό χρόνο ανάλυσης (~7 λεπτά) την καθιστούν κατάλληλη για εφαρμογή σε αναλύσεις ρουτίνας.

4. Βιβλιογραφία

1. Drake M T, Clarke B L, Khosla S., "Bisphosphonates: Mechanism of Action and Role in Clinical Practice", Mayo. Clin. Proc. 83(9), pp. 1032-1045, 2008, Rochester, MN.
2. Hemstrom P., Irgum K., "Hydrophilic interaction chromatography", Journal of Separation Science 29, pp. 1784-1821, 2006, Σουηδία.
3. Dejaegher B., Heyden Y.V., "HILIC methods in pharmaceutical analysis", Journal of Separation Science 33, pp. 698-715, 2010, Βέλγιο.
4. Kyriakides D., Panderi I., "Development and validation of a reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatographic method for the determination of risedronate in pharmaceutical preparations", Analytica Chimica Acta 584, pp. 153-159, 2007, Ελλάδα.
5. 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, Ινδία.