ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΟΚΤΡΕΟΤΙΔΙΟΥ ΣΕ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ ΜΕ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΔΡΟΦΙΛΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΚΟ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ (HILIC- FL)

Ελένη Δούλου[1], Άνθη Πάρλα[1], Καλομοιράκη Μαρίνα[2], Κουππάρης Μιχαήλ[3], Χανιωτάκης Νικόλαος[2], Κυριακή Θερμού[4], Ειρήνη Παντερή[1]

[1]Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης, Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

[2]Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, Κρήτης

[3] Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

[4]Σχολή Ιατρικής, Τμήμα Φαρμακολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, Κρήτης

email: irenepanderi@gmail.com

Περίληψη

Η σωματοστατίνη (SS) είναι πεπτίδιο που αναστέλλει την έκκριση της αυξητικής ορμόνης από την υπόφυση είτε με απευθείας αλληλεπίδραση στην υπόφυση είτε έμμεσα μέσω της καταστολής της απελευθέρωσης της αυξητικής ορμόνης (GHRH-Growth Hormone Releasing Hormone). Η λειτουργία της σωματοστατίνης ως νευροδιαβιβαστή στον εγκέφαλο έχει επίδραση στις γνωστικές, κινητικές, αισθητηριακές και αυτόνομες λειτουργίες. Απαντάται σε μεγάλες ποσότητες στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα, στο λεπτό και παχύ έντερο, στο πάγκρεας και σε μικρότερες ποσότητες στο θυρεοειδή, στα επινεφρίδια, τα νεφρά και τον προστάτη. Παρουσιάζεται με δύο ενδογενείς βιοδραστικές μορφές, τη σωματοστατίνη 14 (SS14) και τη σωματοστατίνη 28 (SS28) που δρουν ως νευροδιαβιβαστές και ως νευρο-ορμόνες. Η χρήση των βιοδραστικών μορφών SS14 ή SS28 στην ιατρική θεραπεία είναι περιορισμένη, λόγω του μικρού χρόνου ημίσειας ζωής τους in vivo (2-3 λεπτά). Αυτό έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη αναλόγων δομών της σωματοστατίνης τα οποία είναι κυκλικά πεπτίδια και συντελούν στη θεραπεία αρκετών ορμονοεξαρτώμενων ασθενειών.

Το οκτρεοτίδιο είναι ένα συνθετικό, μακράς δράσης, κυκλικό οκταπεπτίδιο ανάλογο της υποθαλαμικής ορμόνης σωματοστατίνης, από την οποία έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής και περισσότερη εκλεκτικότητα στην αναστολή της έκκρισης ορμονών. Χορηγείται για τον έλεγχο της υπερέκκρισης των ορμονών σε όγκους της υπόφυσης, σε ενδοκρινικούς παγκρεατικούς όγκους και σε καρκινοειδείς όγκους παρεμποδίζοντας την απελευθέρωση της αυξητικής ορμόνης, της ινσουλίνης, της γλυκαγόνης και άλλων ορμονών. Ενδείκνυται για τη θεραπεία της ακρομεγαλίας, για την αντιμετώπιση βαριάς διάρροιας και εξάψεων συμπτώματα που παρατηρούνται σε νευροενδοκρινικούς όγκους παγκρέατος και γαστρεντερικού συστήματος και για τη θεραπεία αιμορραγίας κιρσών οισοφάγου. Στην εργασία αναπτύσσεται μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού του οκτρεοτιδίου σε φαρμακευτικό σκεύασμα. Δεδομένου του ότι το οκτρεοτίδιο είναι ένα πολικό μόριο η χρωματογραφική της μελέτη έγινε με υγροχρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης σε συνδιασμό με φθορισμομετρικό ανιχνευτή (HILIC) Η χρωματογραφία HILIC βρίσκει σήμερα ευρεία εφαρμογή και παρέχει μια εναλλακτική προσέγγιση για τον αποτελεσματικό διαχωρισμό πολικών ενώσεων σε πολικές στατικές φάσεις και αποτελεί ιδανική επιλογή για χρωματογραφία πεπτιδίων.

Λέξεις-Κλειδιά: Ανάλογα σωματοστατίνης, οκτρεοτίδιο, HILIC, ποσοτικός προσδιορισμός.

Abstract
Somatostatin (SS) is a peptide that inhibits the secretion of growth hormone from the pituitary gland. The use of bioactive forms in medical treatment is limited due to their short half-life in vivo. Octreotide is a synthetic, cyclic octapeptide analogue of somatostatin hypothalamic hormone, of which it has a longer half-life and more selectivity in the inhibition of hormone secretion. It is used to control the hypersecretion of hormones in pituitary tumors, endocrine pancreatic tumors and carcinoid tumors. It is indicated for the treatment of acromegaly for the treatment of severe diarrhea and hot flushes observed in neuroendocrine tumors of the pancreas and gastrointestinal tract and for the treatment of esophageal variceal bleeding.
The chromatographic study was performed by hydrophilic interaction liquid chromatography in combination with a fluorimetric detector (HILIC). Chromatographic separation was performed on a Xbridge® HILIC BEH analytical column with isocratic elution and a flow rate of 0,25 mL min^{-1}. The method was validated according to ICH guidelines.

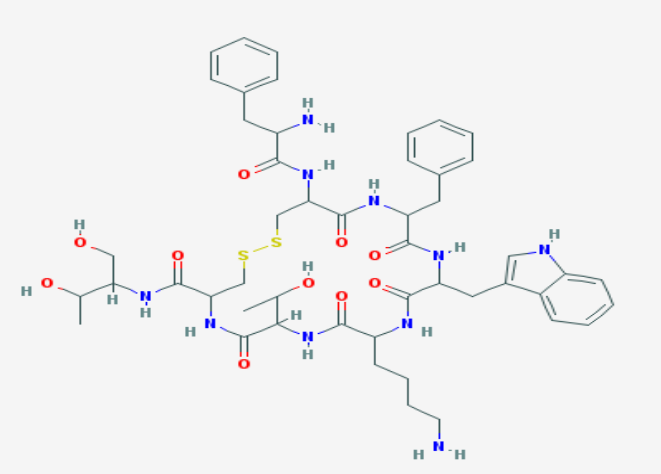
Key-Words: *somatostatin, octreotide, HILIC, validation*

1. Εισαγωγή

Η υγροχρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης, HILIC, βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην ανάλυση διαφόρων πολικών αναλυτών, που παρουσιάζουν ιδιαίτερη ετερογένεια ως προς τη δομή τους και αποτελεί ιδανική επιλογή για τη χρωματογραφία πεπτιδίων. Σημαντική είναι η συμβολή της HILIC στο διαχωρισμό πολικών ουσιών οι οποίες εμφανίζουν μικρή ή και ελάχιστη κατακράτηση στις ευρύτερα διαδεδομένες στήλες αντίστροφης φάσης. Αν και η συγκεκριμένη τεχνική δημιουργήθηκε στις αρχές της δεκαετίας του ’90, την τελευταία 15ετία άρχισε να χρησιμοποιείται πιο διαδομένα, κυρίως εξαιτίας της ανάγκης να αναλύονται ικανοποιητικά πολικές ουσίες σε εξαιρετικά πολύπλοκα δείγματα. Στη HILIC επικρατεί μικτός μηχανισμός συγκράτησης που περιλαμβάνει φαινόμενα κατανομής, προσρόφησης, ιοντικής και υδρόφοβης αλληλεπίδρασης κι επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Η έκταση, με την οποία ο κάθε μηχανισμός ελέγχει τη συγκράτηση, εξαρτάται, τόσο από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των αναλυτών και του πληρωτικού υλικού, όσο και από τη σύσταση της κινητής φάσης. 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. Είναι σημαντικό, για τον παραπάνω λόγο, 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, με το νερό να είναι ένας αρκετά ισχυρός διαλύτης στην HILIC καθώς έχει την μεγαλύτερη εκλουστική ισχύ Ruta (2013). Οι κινητές φάσεις στη HILIC μπορούν να περιέχουν 40-97% ακετονιτρίλιο σε νερό, ή και κάποιο πτητικό ρυθμιστικό διάλυμα. Ως οργανικός τροποποιητής επιλέγεται συνήθως το ακετονιτρίλιο, το οποίο έχει μέτρια εκλουστική ισχύ, επομένως, γίνεται αντιληπτό ότι όσο μεγαλύτερο είναι το % ποσοστό του ακετονιτριλίου στην κινητή φάση, τόσο αυξάνεται η συγκράτηση των αναλυτών. Η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος παίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της έκτασης των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα

μεταξύ αναλυτών και στατικής φάσης. Τα άλατα που χρησιμοποιούνται κυρίως, λόγω της ισχυρής διαλυτοποίησης τους στο νερό, είναι το οξικό αμμώνιο και το μυρμηκικό αμμώνιο, με τις συγκεντρώσεις του ρυθμιστικού διαλύματος να κυμαίνονται από 5mM με ανώτατο όριο 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.

Η παρούσα εργασία έχει ως στόχο την ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου ποσοτικοποίησης του οκτρεοτιδίου σε ενέσιμο σκεύασμα με την τεχνική της υγροχρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης σε συνδυασμό με φθορισμομετρικό ανιχνευτή (HILIC-FL). Το οκτρεοτίδιο (σχήμα 1) είναι ένα συνθετικό, μακράς δράσης, κυκλικό οκταπεπτίδιο, με βελτιωμένες φαρμακοκινητικές ιδιότητες σε σχέση με την απλή μορφή της σωματοστατίνης, από την οποία έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής και περισσότερη εκλεκτικότητα στην αναστολή της έκκρισης ορμονών Battershill (1989). Χορηγείται για τον έλεγχο της υπερέκκρισης των ορμονών σε όγκους της υπόφυσης, σε ενδοκρινικούς παγκρεατικούς όγκους και σε καρκινοειδείς όγκους, Costa (2013), παρεμποδίζοντας την απελευθέρωση της αυξητικής ορμόνης, της ινσουλίνης, της γλυκαγόνης και άλλων ορμονών. Ενδείκνυται για τη θεραπεία της ακρομεγαλίας, για την αντιμετώπιση βαριάς διάρροιας και εξάψεων συμπτώματα που παρατηρούνται σε νευροενδοκρινικούς όγκους παγκρέατος και γαστρεντερικού συστήματος και για τη θεραπεία αιμορραγίας κιρσών οισοφάγου.



Σχήμα 1: Χημική δομή του οκτρεοτιδίου

Το οκτρεοτίδιο είναι υγροσκοπική και φωτοευαίσθητη ένωση και η οδός χορήγησης του φαρμάκου είναι με ενδοφλέβια και υποδόρια ένεση.

2. Μεθοδολογία

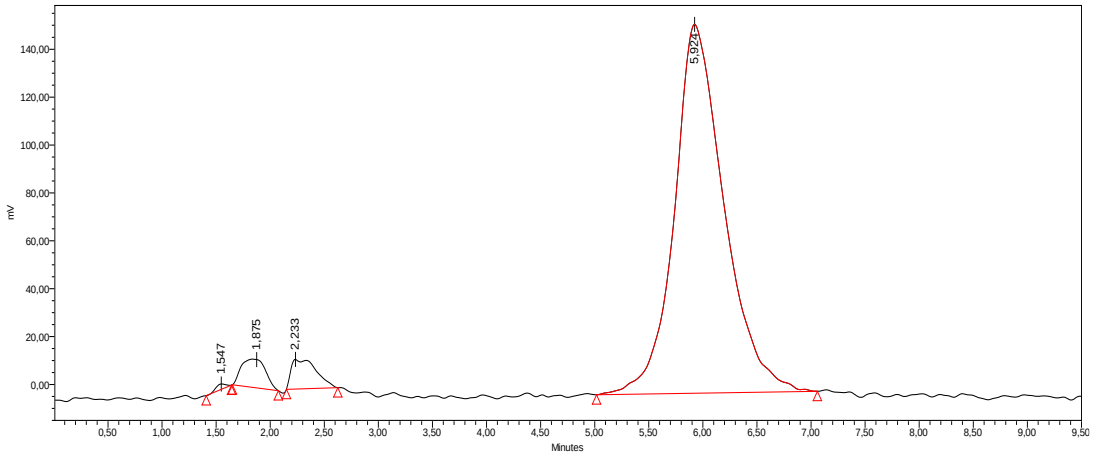
Η επιλογή των κατάλληλων συνθηκών για την ανάλυση του οκτρεοτιδίου πραγματοποιήθηκε λαμβάνοντας υπόψη πληροφορίες ως προς τον ιοντισμό και τη λιποφιλία του με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος ADME. Το οκτρεοτίδιο είναι ένα πολικό οκταπεπτίδιο με τιμή $\log D_{(pH=7)}$ -2,65 και αναμένεται με χρωματογραφία HILIC να συγκρατηθεί ικανοποιητικά. Η χρωματογραφική συμπεριφορά του μελετήθηκε σε μια σειρά από αναλυτικές στήλες HILIC και τελικά επιλέχθηκε ως κατάλληλη για τη μελέτη η αναλυτική στήλη Xbridge® HILIC BEH.

2.1 Οργανολογία

Το σύστημα υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από αντλία ισοκρατικής έκλουσης της εταιρίας Spectra Physics, και σύστημα εισαγωγής δείγματος της Rheodyne, με βρόχο εισαγωγής δείγματος όγκου 20 μL. Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκε φθορισμομετρικός ανιχνευτής Perkin Elmer, μοντέλο LS-30. Το μήκος κύματος διέγερσης ορίστηκε στα 230 nm, ενώ το μήκος εκπομπής ορίστηκε στα 280 nm. Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι η στήλη Xbridge® HILIC BEH με διαστάσεις 150 x 2,1 mm και διάμετρο σωματιδίων 3,5 μm. Η ταχύτητας ροής της κινητής φάσης ρυθμίστηκε στα 0,25 mL min^{-1}. Η επεξεργασία και η ανάλυση των χρωματογραφικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα Empower της εταιρίας Waters.

2.2 Ανάπτυξη της μεθόδου

Κατά τη διαδικασία της ανάπτυξης της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκε τόσο οξικό όσο και μυρμηκικό αμμώνιο ως άλας στην κινητή φάση. Η κινητή φάση αποτελείται από μίγμα που περιέχει υψηλό ακετονιτριλίου με μικρό ποσοστό νερού παρουσία άλατος. Η κατεργασία του δείγματος πραγματοποιήθηκε με αραίωση του ενέσιμου σκευάσματος Isokawa (2014). Στο σχήμα 2 παρουσιάζεται τυπικό χρωματογράφημα του οκτρεοτιδίου σε συγκέντρωση 1 μg mL^{-1} σύμφωνα με τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες.



Σχήμα 2: Τυπικό χρωματογράφημα του οκτρεοτιδίου με την τεχνική HILIC-FL.

2.3 Μελέτες Σταθερότητας

Πραγματοποιήθηκαν μελέτες επιταχυνόμενης διάσπασης σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας. Στις μελέτες αποικοδόμησης μελετήθηκε η επίδραση των εξής συνθηκών: όξινο περιβάλλον με HCl, βασικό περιβάλλον με NaOH, οξείδωση με H_2O_2. Επιπλέον, το ενέσιμο σκεύασμα τοποθετήθηκε σε κλίβανο στους 50 ºC. Παράλληλα αμπούλες υπόκεινται σε θέρμανση στους 65 °C υπό την επίδραση ακτινοβολίας UV. Σε όλες τις περιπτώσεις για τον υπολογισμό της % ανάκτησης πραγματοποιείται σύγκριση των διαλυμάτων με πρότυπο διάλυμα οκτρεοτιδίου το οποίο δεν έχει υποβληθεί σε επιταχυνόμενη διάσπαση.

2.4 Επικύρωση

Η αναπτυχθείσα μεθοδολογία αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας της, γραμμικότητα, ορθότητα, πιστότητα, όριο ανίχνευσης, όριο ποσοτικοποίησης και % ανάκτηση. Συγκεκριμένα, για την αξιολόγηση της γραμμικότητας της μεθόδου

παρασκευάζεται περιοχή προτύπων, τουλάχιστον πέντε διαφορετικών συγκεντρώσεων του αναλύτη κατανεμημένων ομοιόμορφα στην αναμενόμενη περιοχή εργασίας. Κατασκευάστηκαν και αναλύθηκαν τρεις καμπύλες αναφοράς σε τρεις διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες. Ο προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης (Limit Of Detection, LOD) και του ορίου ποσοτικοποίησης (Limit Of Quantification, LOQ) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους ορισμούς του ICH Topic Q2B. Η προτεινόμενη μέθοδος ελέγχθηκε ως προς την ορθότητα και την πιστότητά της, τόσο κατά τη διάρκεια μιας εργαστηριακής ημέρας, όσο και μεταξύ των ημερών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ελέγχου σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων. Επιπλέον ελέγχθηκε η ανθεκτικότητα της και για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η επιρροή μικρών προμελετημένων διαφοροποιήσεων των παραμέτρων της μεθόδου στο χρόνο ανάσχεσης και το εμβαδόν κορυφής του οκτρεοτιδίου. Η προτεινόμενη HILIC-FL μέθοδος εφαρμόσθηκε στην ανάλυση του οκτρεοτιδίου σε ενέσιμο σκεύασμα.

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-FL επιτρέπει την γρήγορη χρωματογραφική ανάλυση του οκτρεοτιδίου (χρόνος ανάλυσης < 10 λεπτά). Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από γραμμικότητα, ικανοποιητική ακρίβεια και επαναληψιμότητα, τόσο εντός της ημέρας, όσο και μεταξύ των ημερών. Η μέθοδος κρίθηκε ανθεκτική καθώς μικρές και σταδιακές μεταβολές κάποιων παραμέτρων επέφεραν ελάχιστες μόνο διακυμάνσεις στις υπόλοιπες παραμέτρους. Την ανάπτυξη και αξιολόγηση της μεθόδου ακολούθησαν δοκιμασίες σταθερότητας του φαρμάκου σε διάφορες συνθήκες φύλαξης. Η αναπτυχθείσα μεθοδολογία εφαρμόστηκε με επιτυχία σε ανάλυση ενέσιμου σκευάσματος. Τα παραπάνω αποτελέσματα καθιστούν τη μέθοδο κατάλληλη να εφαρμοστεί σε φαρμακευτικές αναλύσεις ρουτίνας.

Βιβλιογραφία

1. Ruta J., Rudaz S., McCalley D.V., Veuthey J.L. and Guillarme D., A systematic investigation of the effect of sample diluent on peak shape in hydrophilic interaction liquid chromatography", Journal of Chromatography A, 1217, p.p. 8230-8240, 2010, Geneva, Switzerland.
2. Isokawa M., Funatsu T. and Tsunoda M., "Evaluation of the effects of sample dilution and volume in hydrophilic interaction liquid chromatography", Chromatographia, 77, p.p. 1573-1556, 2014, Tokyo, Japan.
3. Battershill P.E. and Clissold S.P. "Octreotide. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in conditions associated with excessive peptide secretion", Drugs, 38(5), p.p. 658-702, 1989, Auckland, New Zealand.
4. Costa F. and Gumz B. "Octreotide- A Review of its Use in Treating Neuroendocrine Tumours", European Oncology & Haematology, 9(2), p.p. 105–109, 2013, Brazil.