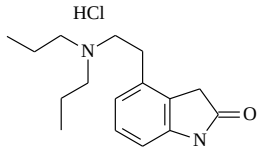
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ HILIC-ESI/MS ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ ΣΕ ΔΙΣΚΙΑ ΡΟΠΙΝΙΡΟΛΗΣ

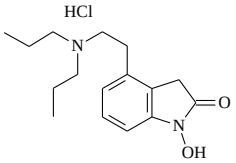
Βασιλική Μπρακούλια[1], Ανδρέας Κακούρης[2], Βικτωρία Σαμαρά[2] και Ειρήνη Παντερή[1]
[1]Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης, Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
[2]Τμήμα Έρευνας και Ανάπτυξης, Pharmathen S.A. 21, Παλλήνη, Αττική, Ελλάδα
email: irenepanderi@gmail.com

Περίληψη

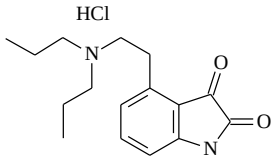
Η ανίχνευση, η ποσοτικοποίηση και ο έλεγχος των προσμίξεων ενός φαρμακευτικού προϊόντος είναι ένα πολύ σημαντικό μέρος της ανάπτυξης του προϊόντος και της εναρμόνισης του με τους διεθνείς κανονισμούς. Η υδροχλωρική ροπινιρόλη ανήκει στην κατηγορία των ντοπαμινεργικών αγωνιστών, συνδέεται εκλεκτικά με τους D2, D3 και D4 υποδοχείς ντοπαμίνης και έχει εγκριθεί για την καταπολέμηση των συμπτωμάτων της νόσου του Parkinson. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των προσμίξεων σε δισκία ροπινιρόλης είναι απαραίτητος, έτσι ώστε να διασφαλιστεί ότι αυτές βρίσκονται εντός προκαθορισμένων, από τη νομοθεσία, ορίων και ότι τα δισκία μπορούν να διατεθούν με ασφάλεια στην αγορά. Στην εργασία αναπτύσσεται και επικυρώνεται μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της ροπινιρόλης και των προσμίξεών της σε δισκία με την τεχνική της υγροχρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης-φασματομετρία μαζών (HILIC-ESI/MS). Στο σχήμα 1 παρουσιάζονται οι χημικές δομές τις ροπινιρόλης και των προσμίξεων της.



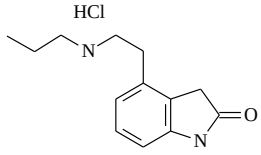
Ropinirole hydrochloride



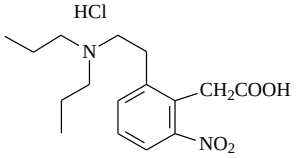
Impurity A (4-[2-(Di-n-propylamino)ethyl]-1-hydroxyindolin-2-one)



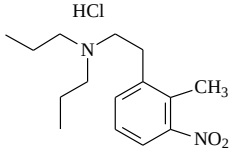
Impurity B (4-[2-(Di-n-propylamino)ethy]indoline-2,3-dione)



Impurity C (4-[2-(Propylamino)ethyl]-1,3-dihydro-1H-indol-2-one)



Impurity D (6-[2-(Di-n-propylamino)ethyl]-2-nitrophenyl-acetic acid)



Impurity E (N-[2-(2-methyl-3- nitrophenyl)ethyl]-N-propylpropan-1-amine)

Σχήμα 1. Χημικές δομές της ροπινιρόλης και των προσμίξεων της

Για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου, 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.

Λέξεις-Κλειδιά: *Ροπινιρόλη, προσμίξεις, HILIC, ESI/MS, ποσοτικός προσδιορισμός.*

Abstract

Ropinirole hydrochloride, 4-[2-(dipropylamino)ethyl]-l,3-dihydro-2H-indol-2-one, belongs to a class of non-ergoline dopamine agonists which bind specifically to D2 and D3 receptors with a selectivity similar to that of dopamine, and it is approved for the treatment of the signs and symptoms of Parkinson's disease both as initial therapy and as an adjustment therapy with levodopa. In addition, ropinirole is efficacious in the management of more advanced Parkinson's disease in patients experiencing motor complications after long-term use of levodopa and it is administered for the treatment of restless legs syndrome. In this work a hydrophilic interaction liquid chromatographic method coupled with mass spectrometric detection was developed of the five impurities namely impurity 1, impurity 2, impurity 3, impurity 4 and impurity 5 in pharmaceutical preparations containing ropinirole as the parent compound. Separation was performed using a ZIC® -HILIC analytical column operated under isocratic conditions with a flow rate of 0.25 mL min^{-1}. The method was validated according to ICH guidelines for impurities and drug products in terms of linearity, sensitivity, precision, accuracy and stability.

Key-Words: *Ropinirol; Impurities; HILIC;ESI/MS; Quantitation*

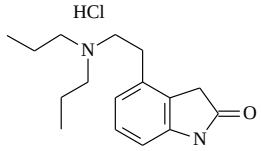
1. Εισαγωγή

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 Φαρμακοποιίας και τους διεθνείς κανονισμούς Singh (2012). Η υγροχρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης HILIC, Hemström (2006), αποτελεί μία τεχνική χρωματογραφικής ανάλυσης η οποία τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει να χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό προσμίξεων από τις δραστικές ενώσεις, Machairas (2018). 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. Τα άλατα που χρησιμοποιούνται κυρίως, λόγω της ισχυρής διαλυτοποίησης τους στο νερό, είναι το οξικό αμμώνιο και το μυρμηκικό αμμώνιο. 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.

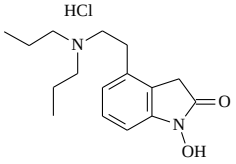
Η παρούσα εργασία έχει ως στόχο την ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου χρωματογραφικού διαχωρισμού και ποσοτικοποίησης της ροπινιρόλης και των προσμίξεών της σε δισκία με την τεχνική της υγροχρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης σε συνδιασμό με ανιχνευτή φασματόμετρο μαζών (HILIC-PDA). Η χρωματογραφία 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

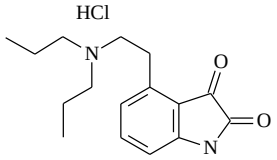
Ο ποσοτικός προσδιορισμός των προσμίξεων σε δισκία ροπινιρόλης είναι απαραίτητος, έτσι ώστε να διασφαλιστεί ότι αυτές βρίσκονται εντός προκαθορισμένων, από τη νομοθεσία, ορίων και ότι τα δισκία μπορούν να διατεθούν με ασφάλεια στην αγορά. Στην εργασία αναπτύσσεται και επικυρώνεται μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της ροπινιρόλης και των προσμίξεών της σε δισκία με την τεχνική της υγροχρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης-φασματομετρία μαζών (HILIC-ESI/MS). Στο σχήμα 1 παρουσιάζονται οι χημικές δομές της ροπινιρόλης και των προσμίξεών της.



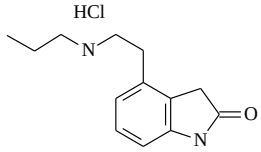
Ropinirole hydrochloride



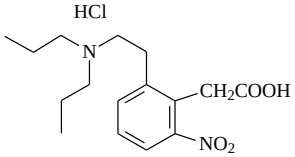
Impurity A (4-[2-(Di-n-propylamino)ethyl]-1-hydroxyindolin-2-one)



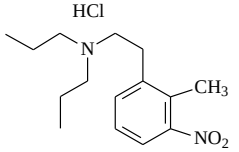
Impurity B (4-[2-(Di-n-propylamino)ethy]indoline-2,3-dione)



Impurity C (4-[2-(Propylamino)ethyl]-1,3-dihydro-1H-indol-2-one)



Impurity D (6-[2-(Di-n-propylamino)ethyl]-2-nitrophenyl-acetic acid)



Impurity E (N-[2-(2-methyl-3-nitrophenyl)ethyl]-N-propylpropan-1-amine)

Σχήμα 1. Χημικές δομές της ροπινιρόλης και των προσμίξεων της

2.3 Οργανολογία

Σύστημα HPLC

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. Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι η στήλη ZIC®-HILIC με διαστάσεις 150 x 2,1 και διάμετρο σωματιδίων 5μm της εταιρίας Merck SeQuantTM. Η ταχύτητας ροής της κινητής φάσης ρυθμίστηκε στα 0,25 mL min^{-1}.

Φασματόμετρο μαζών

Το φασματόμετρο μαζών που χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής των αναλυτών ήταν της εταιρίας Finnigan (Thermo Quest) μοντέλο AQA. Ο ιοντισμός των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με την τεχνική ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό για την παραγωγή θετικών ιόντων ESI(+). Η επεξεργασία των φασμάτων και των χρωματογραφημάτων μαζών έγινε με το λογιστικό πρόγραμμα Xcalibur της εταιρείας IBM (IBM data system). Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική παρακολούθησης προεπιλεγμένου ιόντος (SIM).

2.4 Βελτιστοποίηση της μεθόδου

Η ροπινιρόλη οι προσμίξεις της, 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 αναλυτών 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 ZIC®-HILIC 2,1x150mm με μέγεθος σωματιδίων 5 μm. Η κινητή φάση αποτελείται από μίγμα που περιέχει υψηλό ποσοστό 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}.

2.5 Επικύρωση

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

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-MS επιτρέπει το χρωματογραφικό διαχωρισμό των αναλυτών, ορισμένοι από τους οποίους μοιάζουν δομικά μεταξύ τους, με ισοκρατική έκλουση σε χρόνο μικρότερο από 30 λεπτά με ταχύτητα ροής 0,25 mL min^{-1} και 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, India
2. Hemström P., Irgum K., "Hydrophilic interaction chromatography", Journal of Separation Science, 29, pp. 1784-1821, 2006, Sweden.
3. Machairas G, Panderi I, Geballa-Koukoula A, Rozou S, Antonopoulos N, Charitos C, Vonaparti A., "Development and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography method for the quantitation of impurities in fixed-dose combination tablets containing rosuvastatin and metformin", Talanta, 183, p.p. 131-141, 2018, Athens, Greece