Prednosti tekućinske kromatografije ultra visoke učinkovitosti u razvoju stabilitetno-indikativne metode za kontrolu kakvoće nepafenaka

Ursić, Ivana

Professional thesis / Završni specijalistički

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:413303

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ivana Ursić

PREDNOSTI TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE ULTRA VISOKE UČINKOVITOSTI U RAZVOJU STABILITETNO-INDIKATIVNE METODE ZA KONTROLU KAKVOĆE NEPAFENAKA

Specijalistički rad

Zagreb, 2016.

PSS studij: Razvoj lijekova

Mentor rada: Prof.dr.sc. Biljana Nigović

Specijalistički rad obranjen je dana 10.03.2017. na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu pred povjerenstvom u sastavu:

1. **Prof.dr.sc. Biljana Nigović**
   Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb

2. **Dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek**
   Pliva Hrvatska d.o.o, Zagreb

3. **Dr. sc. Marjana Dürrigl**
   Pliva Hrvatska d.o.o, Zagreb

Rad ima 51 list.

PREDGOVOR

Ovo istraživanje je provedeno u sklopu Poslijediplomskog specijalističkog studija Razvoj lijekova na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu.

Na odabir teme završnog rada najviše je utjecao moj dosadašnji rad u farmaceutskoj industriji, te spoznaja važnosti razvoja preciznih analitičkih metoda za kontrolu kakvoće aktivnih farmaceutskih supstancija.

Ovim radom proširila sam svoje znanje na području razvoja i validacija stabilitetno-indikativnih metoda u farmaceutskoj industriji.

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Biljani Nigović na pristupačnosti i stručnim savjetima vezanim uz izradu završnog rada.

Zahvaljujem kolegi Mislavu Runji (Pliva, TAPI, Istraživanje i razvoj) na literaturi i podijeljenom znanju potrebnom za eksperimentalni dio ovog rada.

Zahvaljujem obitelji i Andri na podršci.

SAŽETAK

CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je analiza studije o razvoju i validaciji stabilitetno-indikativne UHPLC metode za određivanje kontrole kakvoće nepafenaka razvijene u Pliva Hrvatska d.o.o te usporedba s postojećom internom HPLC metodom s naglaskom na prednosti korištenja UHPLC metoda i tehnike masene spektrometrije (LC-MS/MS). Obradit će se i sve literaturno poznate kromatografske metode razvijene i korištene za analitičko ispitivanje nepafenaka u farmaceutskim formulacijama.

MATERIJAL/METODE

Istraživanja provedena u okviru ovog specijalističkog rada obuhvaćaju pregled svih dostupnih publikacija koristeći dostupne bibliografske baze podataka i servise (Medline/PubMed, ScienceDirect, EMBASE i drugih), uz primjenu ključnih riječi poput: *nepafenac, quality control, UHPLC, HPLC, Stability indicating study, forced degradation* i sl.

Napravljena je detaljna studija razvijene UHPLC metode za stabilitetna ispitivanja aktivne farmaceutske supstancije nepafenaka, te prednosti korištenja iste naspram postojeće HPLC metode također razvijene u odjelu Istraživanja i razvoja TAPI R&D Pliva Hrvatska d.o.o.

Za potrebe razvoja stabilitetno-indikativne metode uvjeti prisilne razgradnje su preuzeti iz ICH Q1A i ICH Q1B vodiča za farmaceutsku industriju: kisela i bazična razgradnja, oksidacija, povišena temperatura, fotoliza te povišena vlažnost.

Korišten je Waters UHPLC H-Class s PDA detektorom i gradijentnom pumpom. Optimalna kromatografska kolona je Waters Acquity BEH C18, dimenzija 100 mm x 2,1 mm i promjera čestica 1,7 µm. Za evaluaciju podataka korišteno je Waters Empower 2 CDS upravljačko sučelje. Detekcija nepoznatih onečišćenja je izvršena tehnikom masene spektroskopije, uz korištenje Agilent 6490 LC-MS/MS sistema spregnutog s Agilent 1290 UHPLC te Agilent MassHunter 2003-2007 Data Acquisition for Triple Qual B.01.04 (B84) upravljačko sučelje.

REZULTATI

Aktivna farmaceutska supstancija nepafenak je podvrgnuta studiji prisilne razgradnje (kisela i bazična hidroliza, oksidacija, povišena vlažnost i temperatura, utjecaj svjetlosti) pod instrumentalnim uvjetima novorazvijene UHPLC metode za određivanje sadržaja i onečišćenja da bi se ispitala prikladnost metode za stabilitetna ispitivanja.

Gradijentna UHPLC-UV metoda odjeljuje nepafenak i sva onečišćenja (2-aminobenzofenon, Cl-tionepafenak, tionepafenak, Cl-nepafenak, hidroksi-nepafenak i ciklički nepafenak) koristeći kromatografsku kolonu Waters Acquity BEH C18. Valna duljina detekcije je 235 nm, protok pokretne faze je 0,6 mL/min. Razlučivanje između pikova nepafenaka i detektiranih onečišćenja je veće od 2. Metoda je dokazano selektivna, linearna, precizna, točna, robusna, a određene su granice detekcije i kvantifikacije. Linearnost je dokazana visokim faktorom korelacije između površina pikova i koncentracija analita koji je iznosio $\geq$0,999 za sve analite. Granica detekcije je potvrđena za sve komponente i iznosi 0,005%, relativno u odnosu na koncentraciju ispitivane otopine uzorka od 1,0 mg/mL. Značajna razgradnja je zabilježena u kiseloj, bazičnoj i oksidativnoj razgradnji. Razgradni produkti su identificirani tehnikom masene spektrometrije, dva su identificirana kao poznata procesna onečišćenja (hidroksi-nepafenak i ciklički nepafenak), a identificirana su i četiri nova razgradna produkta.

ZAKLJUČAK

Ukazana je prednost razvoja metode za tekućinsku kromatografiju ultra visoke učinkovitosti nad metodama za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti na primjeru nepafenaka. Studija uvelike doprinosi prikupljanju informacija o stabilnosti same supstancije (ubrzana razgradnja), procesnim onečišćenjima i potencijalnim razgradnim produktima (spregnuta tehnika LC-MS/MS). Razvijena UHPLC metoda ima prednost nad svim literaturno poznatim, zbog separacije svih sastavnica u vremenu od 5 minuta.

SUMMARY

OBJECTIVES

The objective of this research is an analysis of study regarding development and validation of stability-indicating UHPLC method used for quality control of nepafenac. The method was developed in Pliva Croatia and it was compared with already existing in-house HPLC method, focusing on benefits of using UHPLC method and mass-spectroscopy technique (LC-MS/MS). The available literature regarding chromatographic methods used for analytical quality testing of nepafenac in pharmaceutical finished forms will also be reviewed.

MATERIAL/METHODS

This specialist study contains an overview of available publications using bibliographic databases (Medline/PubMed, ScienceDirect, EMBASE etc.) and keywords search (*nepafenac, quality control, UHPLC, HPLC, Stability indicating study, forced degradation* etc.).

The investigation includes detail study regarding developed UHPLC stability-indicating method for quality control of active pharmaceutical substance nepafenac, and benefits of using UHPLC methods over already existing HPLC method also developed in TAPI R&D Pliva Croatia. ICH Q1A and ICH Q1B conditions of forced degradation are used in order to develop stability indicating method (SIM): acid and base hydrolysis, oxidation, humidity, heat and light.

Used instrument was Waters UHPLC H-Class with PDA detector and gradient pump. Optimal chromatographic column was found during method development (Waters Acquity BEH C18, 100 mm x 2.1 mm, 1.7 µm). Used software for raw data evaluation was Waters Empower 2 CDS. For detection of unknown impurities using mass spectroscopy technique, Agilent 6490 LC-MS/MS system coupled with Agilent 1290 UHPLC instrument was used, along with Agilent MassHunter 2003-2007 Data Acquisition for Triple Qual B.01.04 (B84) software.

RESULTS

To test stability of active pharmaceutical ingredient nepafenac, it was subjected to forced degradation under different stress conditions (acid and base hydrolysis, oxidation, humidity, heat and light) according to instrumental parameters taken from novel UHPLC method for quantification of nepafenac assay and impurities. Gradient UHPLC-UV method separates nepafenac and potential impurities (2-aminobenzophenon, Cl-thionepafenac, thionepafenac, Cl-nepafenac, hydroxy-nepafenac and cyclic-nepafenac), using Waters Acquity BEH C18 chromatographic column. Detection wavelength was 235 nm at a flow rate of 0.6 mL/min. The resolution between nepafenac and six potential impurities is found to be greater than 2.0. Method is selective, precise, linear, accurate, and robust with established LOD and LOQ level. Linearity is proven with $r^2 \geq 0.999$ for all components. Limit of detection is 0.005%, with respect to test concentration of 1.0 mg/mL. Significant degradation is observed in acid, base and oxidative degradation. Degradation products are identified using mass spectrometry technique, two of them were found to be known process related impurities (hydroxy-nepafenac and cyclic-nepafenac), whereas four degradation products were identified as new degradation impurities.

CONCLUSION

Benefits of using UHPLC method for quality control of nepafenac over HPLC method was shown. This study provides information regarding the stability of substance (forced degradation), process impurities and potential degradation products (coupled technique LC-MS/MS). Developed UHPLC method has the ability to separate all components of interest within 5 min, and therefore is more applicable for quality testing of nepafenac than any other known analytical HPLC method in literature.

Sažetak

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA 1
2. CILJ ISTRAŽIVANJA 2
3. MATERIJALI I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI 3
3.1. STUDIJA PRISILNE RAZGRADNJE U RAZVOJU STABILITETNO-INDIKATIVNE METODE 3
3.1.1. Fotostabilnost 5
3.1.2. Temperatura i vlažnost 5
3.1.3. Kisela i bazična oksidacija 6
3.1.4. Oksidacija 6
3.2. METODE ANALIZE 7
3.2.1. Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC) 7
3.2.2. Tekućinska kromatografija ultra visoke učinkovitosti (UHPLC) 9
3.2.3. Tekućinska kromatografija ultra visoke učinkovitosti spregnuta s masenim detektorom (LC-MS) 9
3.2.4. Tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS) 10
3.2.5. Analize čistoće pika 11
3.2.6. Bilanca mase 12
3.2.7. Plinska kromatografija (GC) 12
3.3. NEPAFENAK 13
3.3.1. Fizikalno-kemijska svojstva 13
3.3.2. Terapijske indikacije 13
3.4. EKSPERIMENTALNI PODACI 15
3.4.1. Kemijske strukture srodnih spojeva nepafenaka 15
3.4.2. Otopine standarada i uzoraka 19
3.4.3. Studija prisilne razgradnje 20
3.4.4. UHPLC 21
3.4.5. Masena spektrometrija 22
4. RASPRAVA 23
4.1. Razvoj metode i optimizacija separacije 23
4.2. Usporedba postojeće HPLC metode s razvijenom UHPLC metodom 25
4.3. Studija prisilne razgradnje 27
4.4. Identifikacija razgradnih produkata 29
4.5. Validacija metode 31
4.6. Literaturno poznate kromatografske metode za nepafenak 39
5. ZAKLJUČAK 44

6. LITERATURA 46
7. KRATICE 48
8. ŽIVOTOPIS 50

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Nesteroidni protuupalni lijekovi pripadaju grupi najčešće pripisivanih lijekova zbog svojih analgetskih, antipiretskih i protuupalnih svojstava. U oftalmologiji, NSAID (nonsteroidal anti-inflammatory drug) lijekovi se koriste za stabilizaciju širenja zjenice prilikom intraokularnih operacija te u terapiji alergijskog konjunktivitisa, postoperativne upale i boli [1].

S obzirom na nepostojanje monografije u Europskoj farmakopeji (EP) i Američkoj farmakopeji (USP) i literaturno dostupnom malom broju studija o kontroli kakvoće nepafenaka, razvijena je stabilitetno-indikativna UHPLC metoda, pogodna i za kvantifikaciju onečišćenja i sadržaja aktive farmaceutske supstancije. Metoda je razvijena i validirana u odjelu Istraživanja i razvoja TAPI R&D Pliva Hrvatska d.o.o prema svim relevantnim smjernicama farmaceutske industrije. Ukupno vrijeme jedne analize je 10 minuta, s adekvatnom separacijom svih komponenti od interesa unutar 5 minuta. Uz minimalne preinake (mobilna faza) razvijena metoda je transferirana na UHPLC-MS/MS sistem, s ciljem određivanja strukture svih procesnih i razgradnih produkata.

Uvjeti prisilne razgradnje su preuzeti iz ICH Q1A R2[2] te je ovo je ujedno i jedina poznata stabilitetno-indikativna metoda za određivanje kakvoće nepafenaka. Osim što pomaže boljem razvoju i selektivnosti stabilitetno-indikativne metode, studija prisilne razgradnje daje informacije i o putevima razgradnje supstancije, kemijskoj i fizikalnoj stabilnosti kristalnih oblika te stereokemijskoj stabilnosti aktivne farmaceutske supstancije u gotovom ljekovitom obliku. Ova saznanja su neophodna prilikom razvoja farmaceutske formulacije, kao i za unaprjeđenje procesa proizvodnje i pakiranja[3].

U literaturi je dostupno samo nekoliko HPLC-PDA metoda koje se odnose na određivanje kakvoće nepafenaka u farmaceutskim formulacijama. RP-HPLC metoda iz patentne dokumentacije nepafenaka je vremenski dugotrajna (jedna analiza traje 65 minuta) te omogućava separaciju samo 3 komponente. Metoda razvijena na *Pharmaceutical Research Institute* u Poljskoj odjeljuje 8 komponenti, ali je vrijeme trajanja jedne analize 29 minuta što otežava analitiku u rutinskom radu laboratorija kontrole kvalitete.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Stabilitetno-indikativna UHPLC metoda za određivanje kontrole kakvoće nepafenaka je razvijena i validirana u Pliva Hrvatska d.o.o s ciljem prikupljanja informacija o stabilnosti supstancije, procesnim onečišćenjima i potencijalnim razgradnim produktima. Novorazvijena metoda bit će uspoređena s postojećom internom HPLC metodom. Struktura razgradnih produkata određena je tehnikom masene spektrometrije (LC-MS/MS).

Istaknuta je prednost korištenja UHPLC nad HPLC metodama u vidu trajanja analize i potrošnje otapala.

Obradit će se i sve literaturno poznate kromatografske metode razvijene i korištene za analitičko ispitivanje nepafenaka, samostalno kao aktivna farmaceutska supstancija ili kao farmaceutska formulacija.

3. MATERIJALI I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI

3.1. STUDIJA PRISILNE RAZGRADNJE U RAZVOJU STABILITETNO-INDIKATIVNE METODE

Cilj farmaceutske industrije je zaštita zdravlja ljudi omogućavajući pacijentima dostupnost lijekova u odgovarajućim dozama i odgovarajuće djelotvornosti, uz razumne troškove. Stoga su sigurnost i efikasnost glavne dvije značajke terapije lijekovima. Sigurnost je određena farmakološko-toksikološkim profilom same aktivne farmaceutske supstancije, s naglaskom na nepoželjna svojstva uzrokovana onečišćenjima. Svojstva farmaceutske formulacije (identifikacija, jačina, čistoća, kvaliteta) moraju biti stabilna određeno vrijeme, a atributi kvalitete trebaju se pratiti od samog početka (sirovi materijali) pa do kraja proizvodnje (gotovi ljekoviti oblik), uključujući i vrijeme prisutnosti lijeka na tržištu[4]. Svijest o potencijalnoj nezadovoljavajućoj kvaliteti proizvoda na tržištu je prisutna od 1970 g.

United States Pharmacopoeia (USP) je 1975.godine izdala klauzulu o roku valjanosti proizvoda, a 1984. godine je US *Food and Drug Administration* (FDA) izdala prvi vodič za stabilnost proizvoda.

Onečišćenje je, prema smjernicama Međunarodne konferencije o harmonizaciji, svaki sastojak ljekovite tvari koji nema definiran kemijski entitet kao ljekovita tvar[5] ili svaki sastojak farmaceutskog proizvoda koji nije ljekovita ili pomoćna tvar u samom proizvodu[6]. USP klasificira onečišćenja aktivne supstancije u više kategorija: organska (procesna ili razgradna), anorganska onečišćenja i ostatna otapala[7].

ICH vodič za farmaceutsku industriju kategorizira onečišćenja kao:

- organska onečišćenja (procesna onečišćenja, razgradna onečišćenja, onečišćenja koje potječu iz sirovog materijala i intermedijera)
- anorganska onečišćenja (soli, katalizatori, ligandi, teški metali)
- ostali materijali (sredstva za filtraciju, uljen)
- ostatna otapala

Kontroliranje i praćenje onečišćenja daju uvid u kvalitetu i sigurnost proizvoda. Analitičke aktivnosti vezane uz karakterizaciju i kvantifikaciju onečišćenja spadaju među najzahtjevnije

aktivnosti u modernoj farmaceutskoj analizi.

U vodiču koji je izdala *Food and Drug Administration* (FDA) su navedeni zahtjevi za testiranje stabilnosti supstancije s ciljem razumijevanja kako se kvalitete aktivne supstancije i gotovog ljekovitog proizvoda mijenja s vremenom pod utjecajem raznih okolišnih faktora. Poznavanje stabilnosti molekule pomaže prilikom odabira prikladne formulacije i pakiranja, roka valjanosti i pravilnih uvjeta skladištenja što je neophodan dio registracijske dokumentacije[8].

Studija prisilne razgradnje se provodi da bi se:

- razvila i validirala stabilitetno-indikativna metoda
- odredili putevi razgradnje aktivne farmaceutske supstance i gotovog ljekovitog oblika (najčešće prilikom razvojne faze)
- identificirala onečišćenja vezana uz supstanciju ili pomoćne tvari
- došlo do saznanja o samoj molekuli
- razvila stabilnija formulacija
- razvio razgradni profil sličan onom koji se razvija u stabilitetnoj studiji prema ICH uvjetima
- riješili problemi vezani uz stabilnost ('*mass balance*')
- postavile granice specifikacije

U tipičnoj studiji relevantni uvjeti su izlaganje supstancije utjecaju vlage, topline, svjetlosti, hidrolizi (bazična i kisela), te oksidacija ili čak kombinacija uvjeta. Potrebno je održavati nivo razgradnje na poželjnoj razini koji se kreće u rasponu 5-20%. Viši stupanj razgradnje nije poželjan jer nije realan u uobičajenom životnom ciklusu proizvoda, kao što nije poželjan niži stupanj degradacije jer tada studija gubi svoj smisao. Različiti uvjeti studije ubrzane razgradnje mogu generirati iste ili različite razgradne produkte. Tip i opseg razgradnje ovisi o funkcionalnim skupinama molekule i stres uvjetima[9].

Najčešće se koristi 1 uzorak, kao otopina uzorka i/ili uzorak u izvornom obliku. Ako je riječ o gotovim ljekovitim oblicima, i placebo je potrebno podvrgnuti uvjetima sličnim stres uvjetima kojim se ispituje aktivna farmaceutska supstancija, da bi se odredilo podrijetlo nastalih onečišćenja.

3.1.1. Fotostabilnost

Ispitivanje fotostabilnosti je integralni dio studije prisilne razgradnje, pogotovo ako je riječ o fotolabilnim molekulama. Uzorak aktivne farmaceutske supstancije ili gotovog ljekovitog oblika u krutom ili tekućem stanju treba biti podvrgnut utjecaju bijele i UV svjetlosti minimalne jačine 1,2 milijuna lux sati i 200 Wh/m^2. Temperatura mora biti kontrolirana da bi se minimizirao utjecaj temperature na razgradnju uzorka. Nakon ispitivanja, uzorcima trebaju biti određene promjene fizikalnih karakteristika (izgled, bistrina, boja) te sadržaj i onečišćenja.

3.1.2. Temperatura i vlažnost

Općenito govoreći, stupanj reakcije je viši što je viša temperatura. Kruti uzorci API-ja i gotovog ljekovitog oblika se podvrgavaju suhim i vlažnim uvjetima povišene temperature, dok se tekući gotovi ljekoviti oblici podvrgavaju samo suhim uvjetima povišene temperature. Preporuka je da se utjecaj temperature prati u koracima od 10°C iznad temperature za rutinsko praćenje stabilnosti supstancije na ubrzanim uvjetima čuvanja, te da uvjet vlažnosti bude 75% ili viši. Studije mogu biti provedene na višim temperaturama u kraćem vremenu. Utjecaj temperature na termalnu razgradnju je opisan Arrheniusovom jednadžbom[10]:

$$k=Ae^{-Ea/RT}$$

k= specifična brzine reakcije

A= frekvencijski faktor

Ea= energija aktivacije

R= opća plinska konstanta (8,3145 J/Kmol)

T= apsolutna temperatura

Termalna degradacija se uobičajeno provodi na temperaturama 40-80°C. Najšire prihvaćeni koncept je uvjet povišene temperature od 70°C pri uvjetima niske i visoke vlažnosti u trajanju 1-2 mjeseca[11].

3.1.3. Kisela i bazična oksidacija

Hidroliza je jedna od najčešćih razgradnih kemijskih reakcija. Taj kemijski proces uključuje razgradnju kemijskih tvari prilikom reakcije s vodom. Hidroliza u kiselim ili bazičnim uvjetima uključuje katalizu ioniziranih funkcionalnih skupina prisutnih u molekuli. Odabir vrste i koncentracije kiseline ili lužine ovisi o stabilnosti same supstancije. Najčešće korišteni su 0,1 M klorovodična i sumporna kiselina, te 0,1 M natrijeva i kalijeva lužina.

Studija razgradnje započinje pri sobnoj temperaturi. Ukoliko pri uvjetima sobne temperature nema razgradnje, temperatura se povisuje (45-70°C). Studija ne smije trajati dulje od 7 dana. Otopina razgrađenog uzorka se tada neutralizira koristeći prikladnu kiselinu, lužinu ili pufer, da bi se izbjegla daljnja razgradnja.

3.1.4. Oksidacija

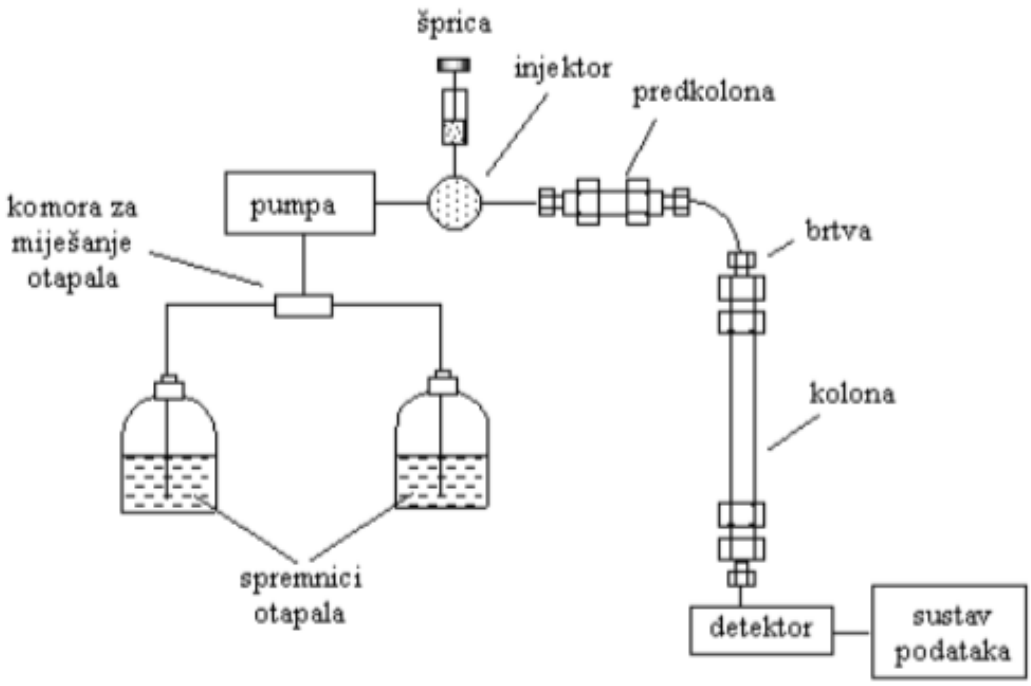
Vodik peroksid je najčešće korišteni reagens pri studijama oksidacije, ali i drugi oksidirajući agensi mogu biti korišteni (metalni ioni, kisik, radikali). Odabir vrste oksidirajućeg agensa, optimalne koncentracije i uvjeta ovisi o prirode same aktivne supstancije. Otopine aktivne farmaceutske supstancije, te kruti/tekući uzorci gotovog ljekovitog oblika mogu biti podvrgnuti oksidativnoj razgradnji. Smatra se da 0,1-3% otopina vodikovog peroksida pri neutralnom pH i sobnoj temperaturi, u vremenu od 7 dana ili stupnju razgradnje do maksimalno 20%, daje optimalan stupanj razgradnje. Uzorci trebaju biti analizirani u različitim vremenskim intervalima da se bi se odredio stupanj razgradnje.

3.2. METODE ANALIZE

3.2.1. Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC) je djelotvorna separacijska tehnika kojom se mogu analizirati nehlapljive i termolabilne tvari, anorganski ioni kao onečišćenja, makromolekule i nestabilni prirodni produkti.

Osnovni dijelovi HPLC instrumenta su rezervoar za otapala pokretne faze, pumpa, injektor, kolona za odjeljivanje i detektor. Na slici 1 prikazana je shema HPLC instrumenta.



Slika 1: Shema HPLC instrumenta

Pokretna faza su otapala visoke čistoće, bez prisustva suspendiranih čestica ili otopljenih plinova. Pumpa ubacuje pokretnu fazu u sustav pod visokim tlakom stalnom brzinom (0,1 mL/min – 10,0 mL/min). Uzorak se unosi mikrolitarskom špricom kroz ventil na kolonu. Kolone su najčešće izrađene od čelika, a razlikuju se po duljini, unutarnjem promjeru i punjenju. Detektorima se prate karakteristike otopljene tvari kao što su apsorpcija u UV/Vis području, fluorescencija, struja na elektrodi ili indeks refrakcije (RI). Najčešće korišteni detektori su

detektori s diodnim nizom (HPLC-DAD) koji omogućuju snimanje cijelog spektra eluiranog analita u UV/Vis području.

Za kromatografiju reverznih faza, nosač nepokretne faze u kolonama je najčešće silika gel, čija površina u potpuno hidroliziranom obliku sadrži silanol skupine (Si-OH) na koje su najčešće vezani nepolarni $–C_{18}H_{37}$ (n-oktadecil) ili $–C_8H_{17}$ (n-oktil) ugljikovodični lanci. U kromatografiji normalnih faza na silika gel mogu biti vezane polarne skupine poput cijano ili amino skupina.

Metoda odabira prilikom analize stabilitetno-indikativnih parametara je obrnuto fazna tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC), prvenstveno zbog visokog stupnja preciznosti, osjetljivosti i mogućnosti detekcije komponenata različite polarnosti. Separacija pikova se postiže odabirom optimalnog tipa kolone, temperature kolone i pH mobilne faze. Isto se dodatno potencira mijenjanjem sastava mobilne faze prilikom razvoja gradijentnih metoda, pri čemu dolazi do ranog eluiranja visoko polarnih komponenti. Pokretna faza i otapalo trebaju biti kompatibilni sa supstancijom, razgradnim produktima i potencijalnim onečišćenjima.

Kromatografski profil otopina “stres“ uzoraka se uspoređuju s otopinama slijepe probe (otopina identična otopini uzorka bez prisutne aktivne farmaceutske supstancije) i s otopinama uzoraka da bi se odredilo podrijetlo pikova. Pikove koji potječu iz otopine slijepe probe nije potrebno kvantificirati. Prikazuje se udio poznatih i nepoznatih onečišćenja “stres“ uzoraka, skupa s kromatogramima otopine slijepe probe, otopine uzorka i otopine “stres“ uzoraka.

Odabrana analitička metoda treba biti dovoljno osjetljiva da detektira onečišćenja na niskim nivoima (primjerice pikove na nivou $\leq$0,05% u odnosu na koncentraciju ispitivane supstancije), te površine detektiranih pikova trebaju biti unutar linearnog dometa detektora. Također, analitička metoda mora detektirati sva onečišćenja za koje je karakteristično da se formiraju prilikom stabilitetne studije.

3.2.2. Tekućinska kromatografija ultra visoke učinkovitosti (UHPLC)

Boljem razumijevanju načela kromatografske tehnike pridonosi i razvoj tehnološki sofisticiranijih instrumenata u 2004. godini. UHPLC instrumenti mogu razviti tlak do 1000 bara, što je dvostruko veća vrijednost tlakova u HPLC sustavu (400-600 bar), čime se omogućava bolje razlučivanje između razdvojenih pikova supstancije u kraćem vremenu. Sam UHPLC instrument je varijanta HPLC instrumenta, ali uz korištenje drugačijih dimenzija kolona (veličina čestica 2,1 μm, kraće dimenzije i uži promjer kolone) te preinake u dizajnu modula instrumenta.

Otapala za pripremu pokretne faze trebaju biti ultra visokog stupnja čistoće te je često potrebna i filtracija. Otopina uzorka treba biti pripremljena na određen način, sve s ciljem da se spriječi potencijalno začepljenje kolone ili kapilara u sustavu, koje su uže u odnosu na klasičan HPLC sustav.

U terminima efikasnosti, točnosti i produktivnosti, razvoj UHPLC tehnike donosi brojne prednosti nad HPLC tehnikom upravo i zbog smanjene potrošnje utrošenih reagensa i kraćeg vremena same analize.

3.2.3. Tekućinska kromatografija ultra visoke učinkovitosti spregnuta s masenim detektorom (LC-MS)

Zbog brzine, razlučivanja i osjetljivosti, UHPLC instrumenti se često kombiniraju s detektorima za spektrometriju masa. Spektrometrija masa je tehnika kojom se analiziraju molekule na temelju njihove mase, točnije ionizirane molekule se razdvajaju na osnovi razlike u omjeru mase i naboja (m/z). Instrument se sastoji od 3 dijela: ionizator, analizator masa i detektor. Prvi korak kod ove analize je ionizacija molekula u ionizatoru. Proces ionizacije obično uključuje fragmentaciju molekule u dva ili više fragmenata, što ukazuje na dijelove od kojih je molekula sastavljena. Najčešće nakon fragmentacije ostane jedan veći dio molekule koji u spektru daje signal s najvećom vrijednosti mase, a zove se molekulski ion. Postoji više načina ionizacije, koji se razlikuju po količini energije koja se predaje molekuli. Metode koje predaju više energije jače fragmentiraju molekulu pa se takve metode ne koriste kod molekula

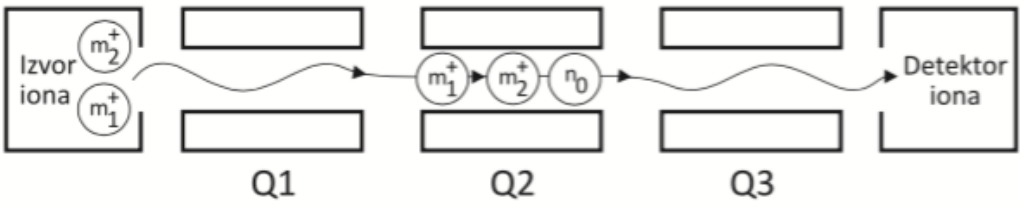
koje se vrlo lako raspadaju ni u slučajevima kad se želi dobiti signal molekulskog iona. Nakon ionizacije dobiveni ioni se provode u analizator koji ih razdvaja.

Najvažniji načini ionizacije molekula su elektronska ionizacija (EI), elektrosprej ionizacija (ESI), ionizacija brzim atomima ili ionima (FAB/FIB), kemijska ionizacija (CI) i matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija (MALDI).

Kod elektrosprej ionizacije uzorak se analizira u obliku otopine. Kao otapalo se koristi neka tvar hlapljivija od analita. Otopljeni analit stvara ione u otopini koja se propušta kroz kapilaru u prostor pod vakuumom. Tamo se otopina zbog odbijanja iona u otopini raspršuje u aerosol. Otapalo isparava, veličina kapljica se smanjuje, ali naboj ostaje konstantan pa dolazi do Coulombovog dijeljenja i nastajanja manjih kapljica te ionizacije analita. Ova metoda se najčešće koristi za ionizaciju makromolekula jer one lako fragmentiraju.

3.2.4. Tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS)

LC-MS/MS predstavlja dodatnu mogućnost analize iona u vremenu ili prostoru, s ciljem da se unaprijedi separacija ili izazove dodatna fragmentacija, pomoću koje možemo kvalitetnije odrediti strukturu analiziranog iona. Spektrometre masa s analizatorom MS/MS možemo podijeli u tri skupine: spektrometri masa s jednim analizatorom, spektrometri masa s više analizatora (trostruki kvadrupol, skraćenica QQQ, engl. *triple quadrupol*), te spektrometri masa s dva analizatora između kojih se nalazi kolizijska ćelija[12].



Slika 2: Shematski prikaz trostrukog kvadrupola

Kvadropol se sastoji od 4 metalne, valjkaste i paralelne elektrode od kojih dvije imaju negativni, a dvije pozitivni naboj, te funkcionira kao filter masa. Jedan par elektroda je spojen

na određeni konstantni napon i promjenjivu radiofrekvenciju, a drugi ima napon i radiofrekvenciju suprotne polarnosti. Ioni prolaze kroz središte kvadropola i pri datim uvjetima napona i frekvencije samo ioni određenog omjera m/z imaju stabilnu putanju i prolaze do detektora (Slika 2.). Variranjem frekvencije ioni različitih m/z se dovode u fokus detektora. Skenirati se mogu sve mase ili samo jedna određena masa.

Korištenje LC-MS/MS tehnike ima prednost nad LC-MS tehnikom upravo zbog povećane osjetljivosti (u QQQ zbog smanjenog šuma detektora) i povećane specifičnosti detekcije. Ova detekcija i separacija se odvija u sekundama, tako da do detekcije određenih fragmenata dolazi dok se još odvija separacija na samoj koloni UHPLC instrumenta. Primjer prednosti korištenja LC-MS/MS tehnike nad LC-MS tehnikom su strukturalni izomeri sličnog kemijskog ponašanja na koloni koji jednostrukim ioniziranjem (LC-MS) daju iste ione u masenom spektru, a dodatnom fragmentacijom (LC-MS/MS) daju različite ionske fragmente.

3.2.5. Analize čistoće pika

Analiza spektralne čistoće pika ("*Peak Purity analysis*") pomaže prilikom razvoja stabilitetno-indikativne kromatografske metode. Spektar uniformnosti molekule se koristi kad prisutnosti koeluirajućih supstancija. Homogenost pika od interesa se uspostavlja prikupljanjem informacija pomoću DAD detektora prilikom analize otopine uzorka i otopine "stres" uzorka. Potrebno je slijediti upute proizvođača detektora zbog postavljanja relevantnih parametara prilikom određivanja spektralne čistoće pika, pri čemu treba poštivati granice linearnosti samog detektora jer UV detekcija postaje nelinearna pri visokim vrijednostima apsorbancije. Odabire se optimalan referentan spektar, te se procjenjuje sposobnost software-a da automatski korigira spektar zbog stalne promjene otapala kod gradijentnih metoda. Odredi se spektralna čistoća pika referentnog standarda, te potom i spektralna čistoća uzorka čija vrijednost mora biti manja od vrijednosti spektralne čistoće pika standarda da bi imali potvrdu da nije došlo do koeluiranja supstanci, točnije da je pik spektralno čist.

Određivanja spektralne čistoće nije apsolutni dokaz čistoće pika i/ili da nema koeluacije s pikom od interesa. Ograničenosti ove analize se uočava u situacijama kad su koeluirajuće supstancije spektralno slične, kada su ispod limita detekcije, kada supstancija ne sadrži

kromofore, ili kada otapanje nije potpuno.

3.2.6. Bilanca mase

Bilanca mase ("*Mass balance*") korištena u kontekstu analitičke metodologije predstavlja sposobnost analiziranja razgradnih produkata. To je proces zbrajanja vrijednosti sadržaja i nivoa razgradnih produkata, te procjena koliko dobivena vrijednost odgovara 100% inicijalne vrijednosti, kad se u obzir uzme analitička pogreška.

Potrebno je procijeniti bilancu masu za sve "stres" uzorke, makar nije primjenjivo u svim situacijama. Sva odstupanja od očekivanih vrijednosti se trebaju objasniti. Variranje odgovora pika glavne supstancije i pikova onečišćenja zbog različite UV apsorbancije je potrebno istražiti koristeći vanjski standard. Potencijan gubitak hlapljivih onečišćenja, formiranje supstancija koje ne apsorbiraju u UV dijelu spektra, formiranje rano eluirajućih komponenti te potencijalno zadržavanje supstancija u kolonu također je potrebno istražiti.

3.2.7. Plinska kromatografija (GC)

Uz navedene metode tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti, potrebno je spomenuti i metode određivanja udjela ostatnih otapala u aktivnoj farmaceutskoj supstanci plinskom kromatografijom. Opće je poznato da se prilikom sinteze aktivne supstancije koriste organska otapala, koje u konačnici mogu potjecati od sirovina, pomoćnih tvari ili intermedijera, ili mogu biti razgradni produkt. Udio organskih otapala je potrebno kontrolirati, zbog eliminacije potencijalnog toksičnog rizika za zdravlje pacijenta.

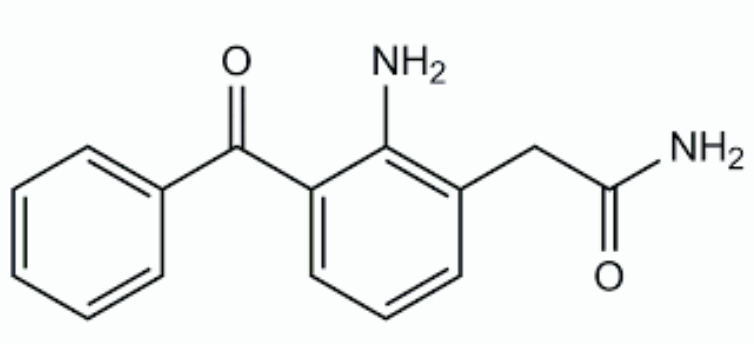
ICH Q3C (R4) vodič za ostatna otapala[13] kategorizira ostatna otapala u 4 klase, prema njihovoj toksičnosti i potencijalnom utjecaja na okoliš: klasa I (poželjno je izbjegavati), klasa II (potrebno je ograničiti udio zbog toksičnosti), klasa III (korištenje dozvoljeno u slučajevima kada je nepraktično uklanjanje), klasa IV (s obzirom na nepostojanje prikladnih toksikoloških podataka, proizvođač je dužan objasniti prisutnost i nivo prisutnih otapala).

3.3. NEPAFENAK

3.3.1. Fizikalno-kemijska svojstva

Nepafenak, kemijskog imena 2-amino-3-benzoilbenzenacetamid, $C_{15}H_{14}N_2O_2$ je žuta kristalična ili praškasta supstancija praktički netopljiva u vodi (Slika 3.). Vodena 0,1% suspenzija ima pH 6,75. Otapa se pri 185°C i ne pokazuje polimorfna svojstva. Akiralna je supstancija bez mogućih stereokemijskih varijacija[14] molekularne mase 254,28 g/mol.

Prema biofarmaceutskom sustavu klasifikacije (Biopharmaceutics Classification System - BCS), koji uzima u obzir topljivost i permeabilnost djelatne tvari, nepafenak spada u BCS klasu 2.



Slika 3. Strukturna formula nepafenaka

3.3.2. Terapijske indikacije

Jedan od najčešće korištenih oftalmoloških pripravaka je upravo 0,1% suspenzija nepafenaka, dok je na tržištu dostupna i 0,3% suspenzija.

Inhibitor je enzima ciklooksigenaze, a time i prostaglandina čija je jedna od osnovnih značajki poticanje upalne reakcije u organizmu. Reducira sužavanje zjenice oka (mioza) pri

upalama, pomaže pri upalama bjeloočnice (skleritis), te kod prevencije i liječenja post-operativnog cistoidnog makularnog edema. Smanjuje bol i foto-fobiju nakon operacija oka, te osjećaj svrbeži povezan s alergijskim konjunktivitisom.

Nepafenak kapi za oči mogu uzrokovati sljedeće nuspojave: glavobolja, bol u predjelu lica, povraćanje, mučnina, suhoću očiju i osjećaj svrbeža, crvenilo očiju, povećanu osjetljivost na svijetlo, zamućenje vida, suzne oči. Dostupan je jedino u režimu izdavanja na recept.

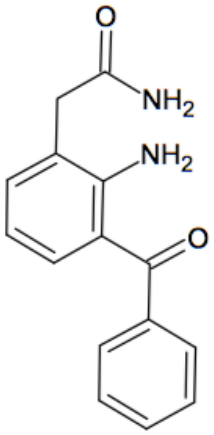
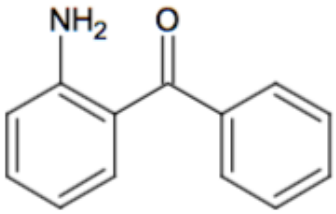
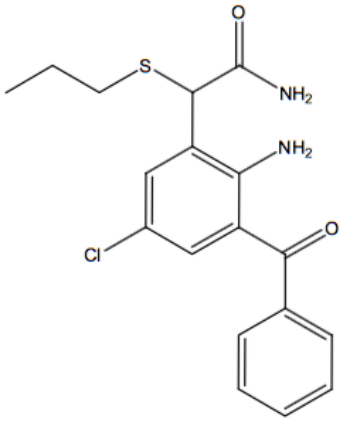
3.4. EKSPERIMENTALNI PODACI

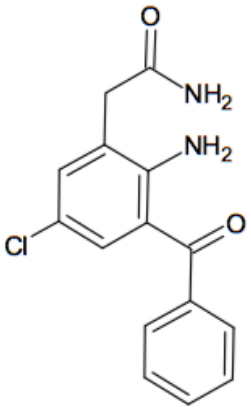
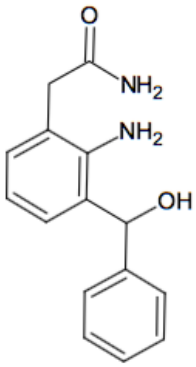
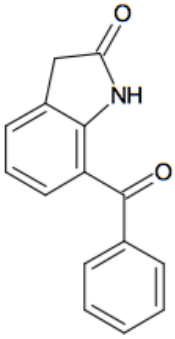
3.4.1. Kemijske strukture srodnih spojeva nepafenaka

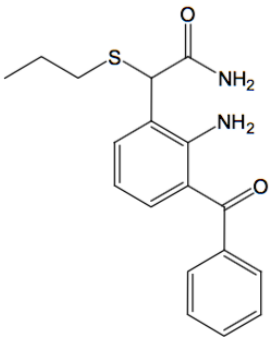
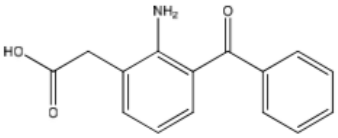
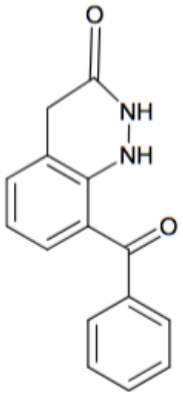
Nepafenak i njegova procesna onečišćenja (Tablica 1) su sintetizirani u Pliva, Zagreb, Hrvatska. Svi standardi procesnih onečišćenja i samog nepafenaka su visoke čistoće: nepafenak (99,6%), Cl-tionepafenak (99%), tionepafenak (98%), Cl-nepafenak (97,5%), hidroksi-nepafenak (97,6%) i ciklički nepafenak (98,2%)[15].

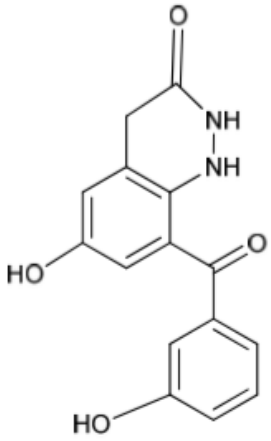
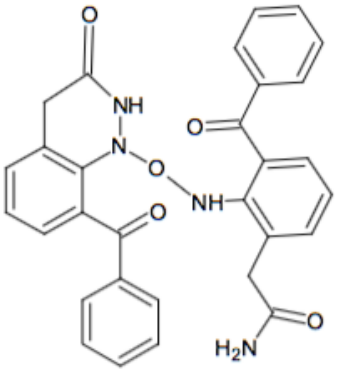
2-aminobenzofenon je kupljen od proizvođača Sigma-Aldrich (St.Luis, MI, USA), acetonitril HPLC razreda čistoće je kupljen od proizvođača J.T.Baker (Darmstadt, Njemačka), kalijev dihidrogen fosfat i amonij formijat su kupljeni od proizvođača Merck (Darmstadt, Njemačka). Ultra pročišćena voda je dobivena koristeći aparat za pročišćavanje vode (MIlipore, Paris, France).

Tablica 1. Kemijska struktura nepafenaka i srodnih spojeva

Analit	*Strukturna formula*	*Molekularna formula Molekularna masa*	*Podrijetlo*
Nepafenak 2-amino-3-benzoilbenzenacetamid		$C_{15}H_{14}N_2O_2$ 254,28	API
2-aminobenzofenon (2-aminofenil)-fenil-metanon		$C_{13}H_{11}NO$ 197,23	Sirovina
Cl-tionepafenak 2-(2-amino-3-benzoil-5-klorofenil)-2-(propiltio)acetamid		$C_{18}H_{19}ClN_2O_2S$ 362,87	Procesno onečišćenje

Analit	*Strukturna formula*	*Molekularna formula Molekularna masa*	*Podrijetlo*
Cl-nepafenak 2-(2-amino-3-benzoil-5-klorofenil)acetamid		$C_{15}H_{13}ClN_2O$ 288,73	Procesno onečišćenje
Hidroksi-nepafenak 2-(2-amino-3-(hidroksi(fenil)metil) fenil)acetamide		$C_{15}H_{16}N_2O_2$ 256,30	Procesno onečišćenje/ razgradno onečišćenje
Ciklički nepafenak 7-benzoil-1,3-dihidro-2H-indol-2-one		$C_{15}H_{11}NO_2$ 237,25	Procesno onečišćenje/ razgradno onečišćenje

Analit	*Strukturna formula*	*Molekularna formula Molekularna masa*	*Podrijetlo*
Tionepafenak 2-(2-amino-3-benzofenil)-2-(propiltio)acetamid		$C_{18}H_{20}N_2O_2S$ 328,43	Procesno onečišćenje (intermedijer)
Razgradi produkt 1 (DP-1)- amfenak		$C_{15}H_{13}NO_3$ 256,1	Razgradno onečišćenje
Razgradni produkt 2 (DP-2)		$C_{15}H_{12}N_2O_2$ 252,1	Razgradno onečišćenje

Analit	*Strukturna formula*	*Molekularna formula Molekularna masa*	*Podrijetlo*
Razgradni produkt 3 (DP-3)		$C_{15}H_{12}N_2O_4$ 284,1	Razgradno onečišćenje
Razgradni produkt 4 (DP-4)		$C_{30}H_{24}N_4O_5$ 520,2	Razgradno onečišćenje

3.4.2. Otopine standarda i uzoraka

Izvorne otopine standarda nepafenaka su pripremljene otapanjem određene količine nepafenaka u otapalu da se dobije koncentracija od 1,0 mg/mL, što je ujedno bio 100%-tni nivo tijekom validacije metode. Izvorne otopine standarda procesnih onečišćenja (smjesa 2-aminobenzofenona, Cl-tionepafenaka, tionepafenaka, Cl-nepafenaka, hidroksi-nepafenaka i cikličkog nepafenaka) u otapalu su bile na nivou od 0,02 mg/mL.

Radne otopine standarda nivoa 1 µg/mL su bile pripremljene koristeći izvorne otopine standarda nepafenaka i procesnih onečišćenja. Smjesa vode i acetonitrila u omjeru 1:1 (v/v) se koristila kao otapalo. Otopine uzoraka nepafenaka za studiju prisilne razgradnje, kao i za

parameter preciznosti i točnost tijekom validacije su pripremljene u koncentraciji 1,0 mg/mL. Sva otapala i otopine su otopljene korištenjem ultrazvučne kupelji i filtrirane pomoću 0,45 mm PFTE filtera (Milipore, USA).

3.4.3. Studija prisilne razgradnje

Studija prisilne razgradnje nepafenaka je provedena koristeći 1,0 mg/mL otopinu standarda nepafenaka prema uvjetima preuzetim iz ICH vodiča za farmaceutsku industriju. Napravljeno je ukupno 6 studija prisilne razgradnje da se procijeni utjecaj kiselo/bazične hidrolize, oksidacije te utjecaja povišenih uvjeta vlažnosti, temperature i svjetlosti na supstanciju.

Kisela hidroliza: dodatak 0,2 mL 0,1 M HCl u 5 mL otopine nepafenaka, te se reakcija odvijala 1 h na 25°C. Nakon toga je otopina neutralizirana do pH 7 pomoću 0,1 M NaOH i nadopunjena otapalom do 10,0 mL.

Bazična hidroliza: dodatak 0,2 mL 0,1 M NaOH u 5 mL otopine nepafenaka, te se reakcija odvijala 1 h na 25°C. Nakon toga je otopina neutralizirana do pH 7 pomoću 0,1 M HCl i nadopunjena otapalom do 10,0 mL.

Oksidacija: dodatak 0,2 mL 30% H_2O_2 u 5 mL otopine nepafenaka, te se reakcija odvijala 1 h na 25°C. Otopina se grijala 10 minuta u vodenoj kupljeni s ciljem otklanjanja viška H_2O_2, te nadopunila s otapalom do 10,0 mL.

Temperatura: Termalna razgradnja se promatrala na nepafenaku u čvrstom stanju i na otopini nepafenaka. Čvrsti uzorak se podvrgnuo razgradnji u sušioniku Kambic (Semic, Slovenija) tokom 24 h na 105°C. Otopina nepafenaka se pripremila otapanjem 10,0 mg nepafenaka u 5 mL otapala, te se držala 1 h na vodenoj kupelji na 80°C. Nakon toga se nadopunila do 10,0 mL otapalom.

Fotostabilnost: Otopina nepafenaka se izložila UV-A radijaciji (200 Wh/m^2) i radijaciji vidljivog dijela spektra (1,2 milijun lux sati) u Suntest CPS+ kabinetu (Atlas, Germany).

Vlažnost: Otopina nepafenaka se izložila uvjetima 80%-tne vlažnosti (RH), 50°C tijekom 30 dana. Dodatno se čvrsti uzorak nepafenaka izložio dugotrajnoj stabilitetnoj studiji u trajanju

od 60 mjeseci na uvjetima 25°C /60%RH, studiji u trajanju 6 mjeseci na uvjetima 40°C/60%RH i studiji u trajanju 6 tjedana na 50°C.

3.4.4. UHPLC

Korišten je Waters UHPLC H-Class (Miliford, MA, USA) sustav koji sadrži autosampler i binarnu pumpu, te PDA detektor za detekciju separacije između pikova nepafenaka i njegovih srodnih spojeva. Signal se pratio koristeći Empower 2 upravljačko sučelje.

Prilikom optimizacije metode ispitane su različite stacionarne faze: C8 (Waters Acquity BEH C8, 100 mm x 2,1 mm, 1,7 µm), fenilna stacionarna faza (Waters Acquity BEH Phenyl, 100 mm x 2,1 mm, 1,7 µm) i C18 (Waters Acquity BEH C18, 100 mm x 2,1 mm, 1,7 µm). Odabrana je C18 stacionarna faza zbog pokazanih najboljih separacijskih svojstava.

Pokretna faza je sadržavala otapalo A (10 mM KH_2PO_4 u 1000 mL vode, pH je podešen na 3,0±0,05 pomoću KOH) i otapalo B (acetonitril).

Protok je 0,6 ml/min s gradijentnim eluiranjem (Tablica 2).

Tablica 2. Prikaz gradijentnog eluiranja

Vrijeme (min)	***B (%, v/v)***
0 – 6,5	30 → 60
6,5 – 8,0	60
8,0 – 8,01	60 → 30
8,01 - 10	30

Temperatura kolone je 50°C.

Podešena valna duljina snimanja detektora je 235 nm, s obzirom na to da je upravo to valna duljina na kojoj nepafenak i njegova onečišćenja imaju maksimalnu apsorbanciju.

Volumen injektiranja je 1 µL. Kao otapalo je korištena smjesa acetonitrila i vode u omjeru 1:1 (v/v).

3.4.5. Masena spektrometrija

Za identifikaciju nepoznatih komponenti formiranih tijekom studije prisilne razgradnje se koristio UHPLC-MS sustav (Agilent 6490 QQQ spregnut s Agilent Infinity 1290 UHPLC (Santa Clara, CA, USA)) s elektrosprej ionizacijom. Sustav se sastojao od binarne pumpe, vakuum degazera, temperaturno kontroliranog kućišta kolone i autosamplera s podešenom temperaturom.

Uvjeti instrumentalne metode su bili slični kao i za UHPLC-PDA, jedina je razlika u pripremi pokretne faze: koristio se 10 mM amonij formijat pH 3,0 umjesto kalijevog hidrogenfosfata.

Analiza se povela koristeći pozitivni ESI način ionizacije. U kolizijskoj ćeliji se koristio dušik. Napon fragmentacije iznosio je 380 V, dok je napon na kapilari bio 3000 V. Temperatura plina je bila 200°C, protok plina je 15 L/min, tlak u raspršivaču je iznosio 20 psi, temperatura grijača plina je bila 400°C, dok je brzina protoka plina grijača bila 12 L/min.

Podaci su obrađeni koristeći Agilent MassHunter 2003-2007 Data Acquisition za Triple Quad B.01.04 (B84) upravljačko sučelje.

4. RASPRAVA

4.1. Razvoj metode i optimizacija separacije

Cilj eksperimentalne studije je razvoj kromatografske metode s optimalnom separacijom pikova 2-aminobenzofenona, Cl-tionepafenaka, tionepafenaka, Cl-nepafenaka, hidroksi-nepafenaka, cikličkog nepafenaka i nepafenaka, kao i razgradnih produkata nastalih tijekom studije prisilne razgradnje. Kromatografska separacija je postignuta testiranjem različitih stacionarnih fazi modificiranih različitim organskim grupama i različitim sastavima pokretne faze. Utjecaj temperature, koncentracija kalij hidrogenfosfata, pH te promjena gradijenta su također ispitane.

U slučaju korištenja C8 stacionarne faze, razlučivanje između pikova hidroksi-nepafenaka i nepoznatog degradacijskog produkta je bilo ispod 2, isto kao i separacija između cikličkog nepafenaka i Cl-nepafenaka.

Prilikom korištenja stacionarne fenilne faze, asimetrija pika (*tailing*) nepafenaka je bila iznad 1,3.

Optimalno razlučivanje između nepafenaka i procesnih onečišćenja je dobiveno korištenjem C18 stacionarne faze.

Utjecaj koncentracije kalij hidrogenfosfata na separaciju se promatrao mijenjanjem koncentracije od 10 mM do 30 mM. Značajna razlika u vremenima zadržavanja nije zamijećena.

Promjena pH ne utječe značajno na vrijeme zadržavanja, simetriju pikova niti broj teorijskih tavana svih specificiranih pikova. Ipak, promjena pH pufera utječe na razlučivanje između pikova razgradnog produkta DP-1 i nepafenaka. Pri pH 6,0 razlučivanje između navedenih pikova je manje od 3. Također, pri pH vrijednostima pufera od 6,0 i 9,0 dolazi do koelucije nepoznatih pikova i pika hidroksi-nepafenaka pri bazičnoj hidrolizi uzorka.

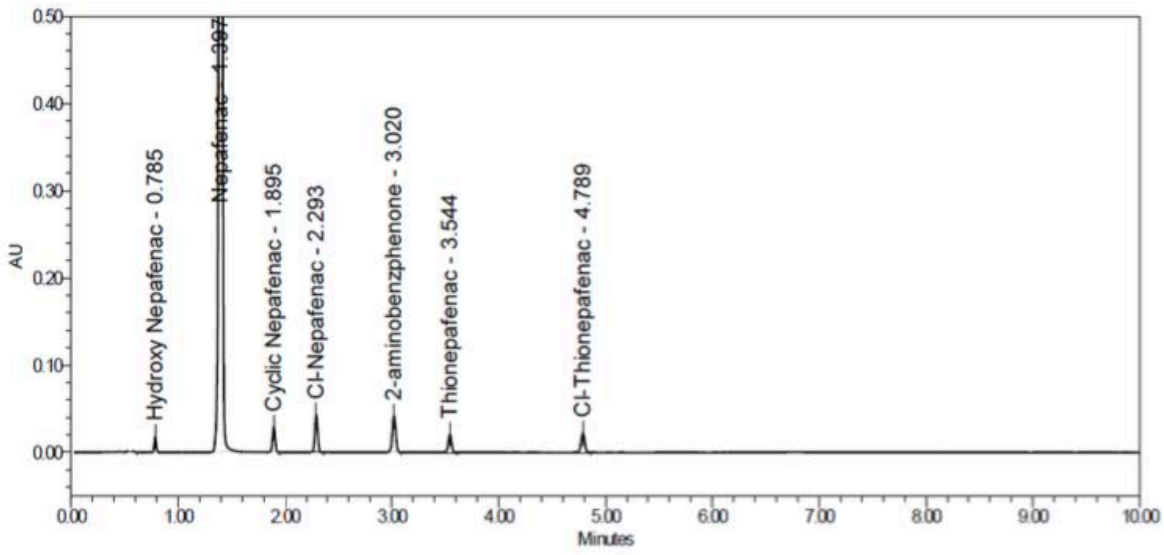
Promjena gradijetnih uvjeta je istražena koristeći pokretnu fazu A (10 mM KH_2PO_4 u 1000 mL vode, pH je podešen na 3,0±0,05 pomoću KOH) i B (ACN). Razlučivanje je bilo slabije prilikom korištenja više udjela pokretne faze B na početku gradijetnog programa. Niži udio

pokretne faze B na početku eluacije rezultira značajnim produljenom trajanja jedne analize (20 min). Optimalan gradijentni program u trajanju jedne analize od 10 min je prikazan u tablici 2.

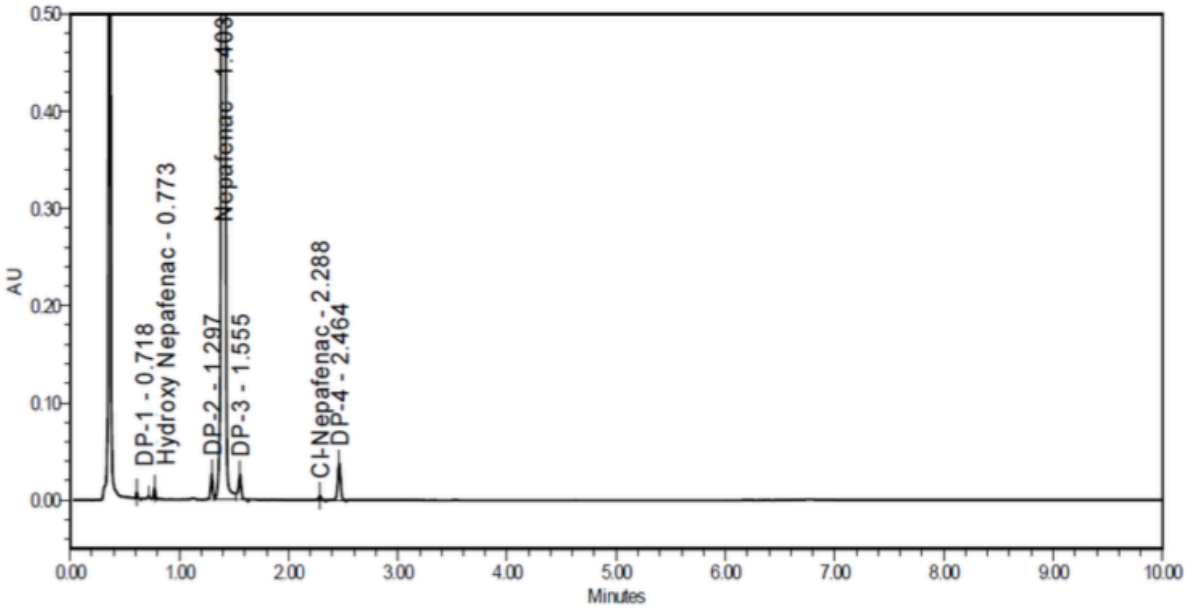
Utjecaj temperature je također ispitan u rasponu od 20°C do 70°C. Primijećeno je da se vrijeme zadržavanja smanjuje s povećavanjem temperature, dok je kod nižih temperatura asimetrija pika nepafenaka iznad 1,2.

Optimalna kromatografska separacija s razlučivanjem višim od 4,0 za sva poznata onečišćenja, razgradne produkte i nepafenak je postignuta korištenjem Waters Acquity BEH C18 kromatografske kolone, uz gradijentni program opisan u tablici 2, s protokom od 0,6 mL/min i temperaturom kolone od 50°C.

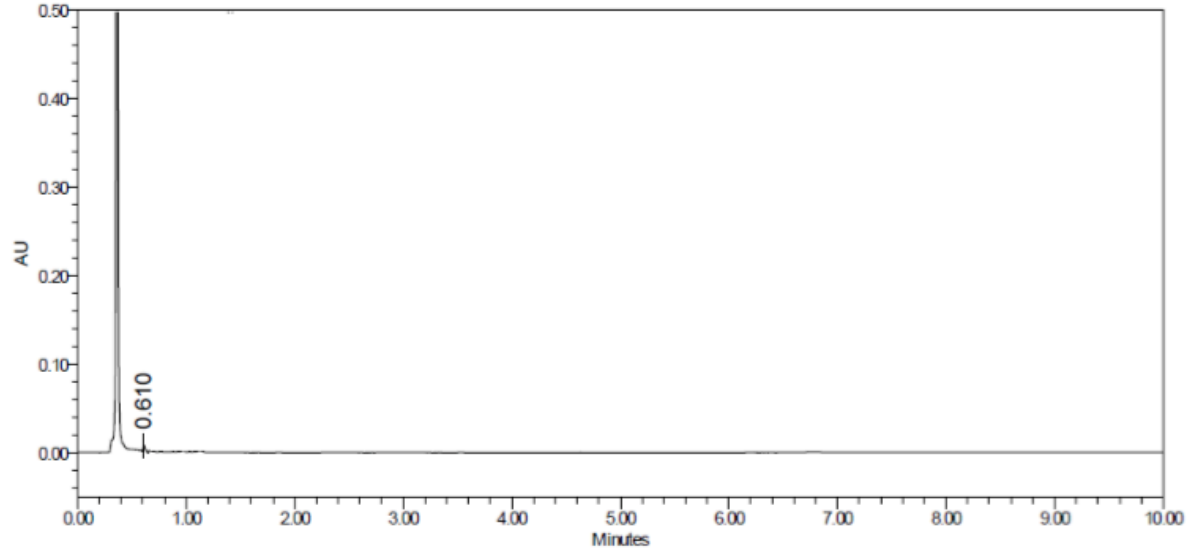
Reprezentativni kromatogram nepafenaka i svih onečišćenja je prikazan na slici 4, kromatogram nepafenaka i razgradnih produkata pod optimalnim uvjetima je prikazan na slici 5, dok je otopina slijepe probe prikazana na slici 6.



Slika 4. Reprezentativan kromatogram nepafenaka i svih onečišćenja



Slika 5. Reprezentativan kromatogram nepafenaka i svih razgradnih produkata



Slika 6. Reprezentativan kromatogram otopine slijepe probe

4.2. Usporedba postojeće HPLC metode s razvijenom UHPLC metodom

Za potrebe analize kontrole kakvoće i određivanja sadržaja i onečišćenja nepafenaka su se u Pliva, Hrvatska koristile dvije HPLC metode.

Metoda za sadržaj je koristila kromatografsku kolonu s C8 stacionarnom fazom i

temperaturom od 50°C, protok je bio 1,0 mL/min, a volumen injektiranja 10 µL. Mobilna faza se sastojala od smjese otopine A (smjesa pufera amonij acetata pH 6,8 i ACN u omjeru 70:30) i otopine B (smjesa pufera amonij acetata pH 6,8 i ACN u omjeru 40:60) u omjeru 50:50. Metoda je bila izokratna u trajanju 5 min, a detektor je podešen na 228 nm. Isti uvjeti su vrijedili i za analizu onečišćenja, uz razliku gradijentnog programa (Tablica 3) i trajanja injektiranja. Potvrđeni limit kvantifikacije je 0,05%.

Tablica 3. Gradijentno eluiranje za analizu onečišćenja

Vrijeme (min)	*B (%, v/v)*
0 – 20,0	0 → 100
20,0 – 35,0	100
35,1	0

Sadržaj i onečišćenja nepafenaka su određeni na 6 serija nepafenaka koristeći postojeće HPLC metode, a istim serijama određeni su sadržaj i onečišćenja nepafenaka koristeći razvijenu UHPLC metodu. Rezultati su prikazani u tablici 4.

Tablica 4. Usporedba rezultata sadržaja i onečišćenja nepafenaka dobiveni s HPLC i UHPLC metodom

Serija	*HPLC*	*UHPLC*	*Cl-Nepafenac (HPLC)*	*Cl-Nepafenac(UHPLC)*
A	99,4	99,9	0,10	0,10
B	99,6	99,8	0,10	0,10
C	99,7	99,9	0,09	0,09
D	100,1	99,8	0,11	0,11
E	100,2	99,9	0,10	0,10
F	100,0	99,9	0,09	0,09

Uočeno je da se s obje metode dobivaju jednaki rezultati analize. Kvantifikacija sadržaja i onečišćenja kod obje metode se vrši korištenjem vanjskog standarda. Onečišćenja iznad

granice kvantifikacije (HPLC LOQ=0,05%) nisu detektirana, osim u slučaju Cl-nepafenaka.

Razvijena UHPLC metoda je bolje rješenje u usporedbi s postojećom HPLC metodom. Viša vrijednost broja teorijskih tavana direktno upućuje na bolju simetriju pikova, te je uspješnija separacija nepafenaka i svih onečišćenja u trajanju jedne analize od samo 10 minuta, čime je omogućeno određivanje u vrlo kratkom vremenu uz nisku potrošnju otapala pokretne faze. UHPLC metodom se u jednoj analizi određuju sadržaj i onečišćenja, dok kod HPLC metode to nije slučaj.

4.3. Studija prisilne razgradnje

Kao što je već navedeno, studija prisilne razgradnje provedena tijekom razvoja analitičke metode je važna za predviđanje potencijalnih problema vezanih za stabilnost molekule te pomaže karakterizaciji glavnih razgradnih produkata.

Jedna serija nepafenaka je podvrgnuta uvjetima prisilne razgradnje preuzetim iz ICH vodiča: hidroliza (kisela koristeći 0,1 M HCl i bazična koristeći 0,1 M NaOH), oksidacija (30% H_20_2), fotoliza, povišena temperatura te povišena vlažnost. S obzirom na to da je procesno onečišćenje Cl-nepafenak prisutno u otopini nepafenaka na nivou od 0,15%, očekivana je njegova detekcija u svim uzorcima.

Značajna razgradnja zabilježena je tijekom kisele hidrolize, prilikom koje je došlo do stvaranja cikličkog nepafenaka.

Do nastanka hidroksi-nepafenaka je došlo prilikom bazične hidrolize.

Pri povišenoj temperaturi, nepafenak u čvrstom stanju je stabilan i ne dolazi do formiranja razgradnih produkata, dok kod nepafenaka u otopini uz hidroksi-nepafenak i ciklički nepafenak se formira i razgradni produkt DP-1 s relativnim vremenom zadržavanja 0,65.

Prilikom oksidacije, dolazi do nastajanja 3 razgradna onečišćenja: DP-2 s RRT 0,92, DP-3 s RRT 1,11 i DP-4 s RRT 1,21 (Slika 5). Detektirani su i hidroksi-nepafenak, te DP-1 s RRT 0,65.

Nepafenak nije osjetljiv na svijetlo ni na povišenu vlažnost, jer u tim uvjetima nije došlo do formiranja razgradnih produkata u usporedbi s kontrolnom pripravom uzorka nepafenaka.

Razgradna onečišćenja na nivou iznad granice kvantifikacije (0,05%) nisu detektirana niti tijekom dugotrajne stabilitetne studije na navedenoj seriji.

Rezultati prisilne razgradnje su dani u tablici 5, dok su rezultati dugotrajne stabilitetne studije analizirani koristeći HPLC metodu prikazani u tablici 6.

Tablica 5. Rezultati prisilne razgradnje

Stres uvjet	***Razgradni produkt (t_R)***	***% onečišćenja ili razgradnog produkta***	***Sadržaj nepafenaka(%)***
Uzorak	/	0,15	99,8
Kisela hidroliza	Ciklički nepafenak (2,32 min)	4,51	95,2
Bazična hidroliza	Hidroksi-nepafenak (0,77 min)	1,14	98,6
Oksidacija	Hidroksi-nepafenak	0,34	96,0
	DP-1 (0,69 min)	0,05	
	DP-2 (1,14 min)	0,60	
	DP-3 (1,29 min)	2,50	
	DP-4 (1,54 min)	0,38	
Termalna razgradnja- API	/	<0,01	99,5
Termalna razgradnja- otopina	Hidroksi-nepafenak	0,15	99,6
	Ciklički nepafenak	0,07	
	DP-1	0,15	
Fotoliza	/	<0,01	99,5
Povišena vlažnost	/	<0,01	99,7

Tablica 6. Rezultati dugotrajne stabilitetne studije koristeći HPLC metode rada

Uvjet	*Razgradni produkt (t_R)*	*% onečišćenja ili razgradnog produkta**	*Sadržaj nepafenaka(%)*
25°C /60%RH 60 mjeseci	/	<0,05	99,5
40°C /60%RH 6 mjeseci	/	<0,05	99,8
50°C 6 tjedana	/	<0,05	99,9

*Napomena: Kao rezultat proizvodnog procesa, Cl-nepafenak je bio prisutan u svim otopinama na nivou 0,15%.

4.4. Identifikacija razgradnih produkata

UHPLC-MS/MS analiza se provela kako bi se odredile m/z vrijednosti glavnih razgradnih produkata formiranih tijekom kisele i bazične hidrolize, oksidacije i uvjeta povišene temperature.

Kromatogram uzorka podvrgnutog oksidaciji ukazuje da je došlo do formiranja nekoliko novih razgradnih produkata. Identifikacija je izvršena koristeći MS/MS tehniku u ESI pozitivnom načinu ionizacije molekule: DP-1 s vrijednosti m/z od 256 $[M+H]^+$, DP-2 s vrijednosti m/z od 285$[M+H]^+$, DP-3 s vrijednosti m/z od 253 $[M+H]^+$ i DP-4 s vrijednosti m/z od 521$[M+H]^+$. Navedeni razgradni produkti do sada nisu bili zabilježeni.

Ciklički nepafenak je bio detektiran kao jedan od razgradnih produkata u radu autora Lipiec-Abramska[16]. Drugo detektirano onečišćenje koje se spominje je 2-amino-3-benzoil-benzenoctena kiselina, koje nije detektirano u ovoj studiji.

Struktura svih onečišćenja je dana u tablici 1, a vremena zadržavanja i optimalni MS/MS uvjeti za identifikaciju razgradnih produkata nepafenaka su dani u tablici 7.

Tablica 7. Vremena zadržavanja i optimalni MS/MS uvjeti za identifikaciju nepafenak razgradnih produkata

	Vrijeme zadržavanja (t_R)	***Prekursor ion (m/z)***	***Napon fragmentacije (V)***	***Energija kolizije (eV)***	***Produkt ion (m/z)***
DP-1	0,65	256	380	30	211, 105, 196
DP-2	1,46	285	380	0	268, 240, 224
DP-3	1,72	253	380	0	236, 208, 180
DP-4	2,78	521	380	40	443, 415, 365

Razgradni produkt DP-1 je identificiran kao amfenak, poznat metabolit nepafenaka[17].

DP-2 je primaran razgradni produkt formiran tijekom oksidativne studije, upravo zbog visoke koncentracije peroksida u uzorku. Tijekom kisele hidrolize dolazi do nastajanja cikličkog nepafenaka, dok u bazičnim uvjetima nastaje hidroksi-nepafenak. Prilikom uvjeta povišene temperature u otopini nepafenaka nastaje hidroksi-nepafenak, ciklički nepafenak i DP-1. Najveću udio onečišćenja nastaje pri kiseloj hidrolizi.

4.5. Validacija metode

Validacija metode je prosudba i dokaz valjanosti i prikladnosti analitičkog postupka za odgovarajuću namjenu, odnosno jamči da će svaki budući rezultat zadovoljiti kriterije prihvata. Prilikom pripreme za validaciju bitno je osigurati dovoljnu količine standarda poznatog identiteta, sadržaja i čistoće, analitičku opremu koja je jasno definirana, karakterizirana i kalibrirana te analitičare koji su upoznati s tehnikom i osposobljeni za rad na instrumentima.

Selektivnost je sposobnost metode da razlikuje analit od ostalih komponenti uzorka ili matriksa uzorka bez interferencija ostalih komponenti sličnog ponašanja[18], i indikativno je svojstvo za više supstancija. U slučaju razvijene UHPLC metode, selektivnost je dokazana detekcijom 6 separiranih pikova onečišćenja nepafenaka (2-aminobenzofenon, Cl-tionepfenak, tionepafenak, Cl-nepafenak, hidroksi-nepafenak i ciklički nepafenak) i razgradnih produkata.

Studija prisilne razgradnje također govori u prilog selektivnosti (Slika 5), prilikom koje je utvrđeno da je ovom metodom postignuta zadovoljavajuća separacija između nepafenaka i razgradnih produkata.

Spektralna čistoća pika prilikom stres studije je također provjerena, koristeći se Waters PDA detektorom. Vrijednosti *Purity angle* i *Purity treshold* stres uzoraka direktno govore o homogenosti samog pika, dok *Match angle* i *Match treshold* služe za potvrdu identifikacije (Tablica 8). Ukoliko je vrijednost *Purity angle* manja od vrijednosti *Purity tresholda*, pik se smatra spektralno čist[19]. Ukoliko je vrijednost *Match angle* manja od vrijednosti *Match tresholda,* identifikacija je potvrđena. Udio onečišćenja svih stres uzoraka je izračunat koristeći se metodom vanjske kalibracije. Bilanca mase (% sadržaj API-ja + % onečišćenja + % razgradnih produkata) je također prikazana (Tablica 5 i 6).

Tablica 8. Vrijednosti čistoće pikova i m/z

Uvjet prisilne degradacije	*Purity Angle*	*Purity Treshold*	*Match Angle*	*Match Treshold*	*m/z*
Nepafenak					
Uzorak	0,113	0,233	0,049	0,174	255,1
Kisela hidroliza	0,121	0,239	0,056	0,183	255,1
Bazična hidroliza	0,119	0,228	0,055	0,176	255,1
Oksidacija	0,118	0,228	0,055	0,173	255,1
Termalna razgradnja - API	0,112	0,231	0,052	0,174	255,1
Termalna razgradnja-otopina	0,113	0,232	0,054	0,177	255,1
Povišena vlažnost	0,115	0,236	0,054	0,169	255,1
25°C/60%RH/60 mjeseci	0,119	0,232	0,048	0,177	255,1
40°C/60%RH/6 mjeseci	0,115	0,236	0,050	0,172	255,1
50°C/6 tjedana	0,118	0,231	0,049	0,175	255,1
Hidroksi-nepafenak					
Uzorak	0,055	0,112	0,027	0,082	256,1
Bazična hidroliza	0,056	0,112	0,029	0,084	256,1
Oksidacija	0,061	0,228	0,026	0,087	256,1
Termalna razgradnja-otopina	0,050	0,232	0,028	0,086	256,1
Ciklički nepafenak					
Uzorak	0,080	0,156	0,040	0,112	237,1
Kisela hidroliza	0,075	0,152	0,038	0,113	237,1
Termalna razgradnja-otopina	0,078	0,163	0,041	0,110	237,1

Prikladnost sustava (System suitability) je skup parametara koji potvrđuju da je kromatografski sustav valjan za određenu namjenu. Značajke ispitivanja i kriteriji prihvata temelje se na načelu da oprema, elektronika, analitičke operacije i uzorci čine cjelovit sustav. Parametri prikladnosti prilikom validacije UHPLC metode su uspoređeni s kriterijima navedenim u ICH vodiču (Tablica 9). Otopina uzorka nepafenaka koncentracije 1,0 mg/mL nacijepljena sa standardima onečišćenja na nivou 1 µg/mL je korištena za ovu evaluaciju. Procesna onečišćenja su dobro odvojena s minimalnim razlučivanjem (*Rs*) od 9,2 u odnosu na prethodno eluirani pik, faktor simetrije pika (*tailing, T*) varira između 0,981 i 1,058, broj teorijskih tavana (*N*) je iznad 9700, faktor zadržavanja (*k'*) je iznad 6,5.

Tablica 9: Parametri prikladnosti sustava

Analit	***N***	***T***	***t_R***	***RRT***	***k'***	***R_S***
Hidroksi-nepafenak	9707	1,058	0,779	0,56	6,5	-
Nepafenak	16233	0,993	1,396	1,00	12,8	15,4
Ciklički nepafenak	30017	0,990	1,902	1,36	17,8	11
Cl-nepafenak	391378	0,990	2,316	1,66	21,9	9,2
2-aminobenzofenone	67643	0,984	3,563	2,55	29,0	13,9
Tionepafenak	44612	0,981	3,033	2,17	34,3	9,5
Cl-tionepafenak	100517	0,989	4,814	3,45	46,7	21,8

Linearnost je svojstvo analitičkog postupka kojim se dobivaju rezultati koji su izravno proporcionalni sadržaju (koncentraciji) analita unutar radnog područja. Prilikom validacije linearnost je ispitana injektiranjem 6 koncentracijskih nivoa otopine standarda nepafenaka i onečišćenja (2-aminobenzofenona, Cl-tionepafenaka, tionepafenaka, Cl-nepafenaka, hidroksi-nepafenaka i cikličkog nepafenaka) u rasponu od 0,1 µg/mL do 2,5 µg/mL (0,01% do 0,25% u odnosnu na nominalnu koncentraciju uzorka). Linearnost je dokazana visokim faktorom korelacije između površina pikova i koncentracija analita koji je iznosio ≥0,999 za sve analite (Tablica 10). %RSD nagiba pravca i y-odsječka je iznosio manje od 5,0% za sve komponente.

Tablica 10. Vrijednosti kalibracijskih krivulja

Analit	*n*	*y-odsječak (a)*	*nagib (b)*	r^2	*RRF*
Nepafenak	5	574,3	17,1	1,000	/
2-aminobenzofenone	5	594,5	15,1	0,999	1,03
Cl-tionepafenak	5	534,8	16,1	0,999	0,93
Tionepafenak	5	550,7	10,3	0,999	0,96
Cl-nepafenak	5	518,2	23,1	0,999	0,90
Hidroksi-nepafenak	5	552,5	22,1	0,999	0,96
Ciklički nepafenak	5	522,7	19,5	0,999	0,91

Granica dokazivanja (limit detekcije, LOD) je najmanja količina analita koja se može dokazati (ali ne i odrediti) u utvrđenim uvjetima analitičkog postupka, dok je ***granica određivanja (limit kvantifikacije, LOQ)*** najmanja količina analita u uzorku koja se može odrediti s prihvatljivom točnošću i pouzdanošću.

Limit detekcije i kvantifikacije su dokazani injektiranjem otopina poznatih koncentracija 2-aminobenzofenona, Cl-tionepafenaka, tionepafenaka, Cl-nepafenaka, hidroksi-nepafenaka, cikličkog nepafenaka prilikom testiranja preciznosti metode te provjerom odnosa signala i šuma. Postavljeni kriterij odnosa signala i šuma za LOQ je bio 10, a za LOD 3 (Tablica 11).

Tablica 11. Preciznost metode, granice detekcije i kvantifikacije

Analit	*Preciznost (RSD,%)*	*Srednja preciznost (RSD,%)*	*LOD (µg/mL)*	*LOQ (µg/mL)*
Nepafenak	2,2	1,0	0,05	0,1
2-aminobenzofenon	1,7	2,0	0,05	0,1
Cl-tionepafenak	1,5	1,6	0,05	0,1
Tionepafenak	3,2	2,4	0,05	0,1
Cl-nepafenak	3,5	2,8	0,05	0,1
Hidroksi-nepafenak	2,1	1,9	0,05	0,1
Ciklički nepafenak	2,7	1,8	0,05	0,1

Točnost metode je blizina rezultata ispitivanja očekivanoj, unaprijed utvrđenoj vrijednosti. Ispitana je trostrukim injektiranjem otopine standarda pripremljenog na 3 koncentracijska nivoa: 0,01% (0,1 µg/mL, LOQ nivo), 0,10% (1,0 µg/mL) i 0,25% (2,5 µg/mL) u odnosu na nominalnu koncentraciju otopine uzorka (1,0 mg/mL) te izračunom iskorištenja. Ovim parametrom dokazana je točnost metode za kvantifikaciju svih 6 onečišćenja nepafenaka (2-aminobenzofenon, Cl-tionepafenak, tionepafenak, hidroksi-nepafenak, ciklički nepafenak). Rezultati su prikazani u tablici 12.

Tablica 12. Rezultati točnosti/iskorištenja metode

Analit	*Koncentracijski nivo*	*Iskorištenje (%) ± RSD*
2-aminobenzofenon	0,01% (LOQ)	99,66±1,1
	0,10%	103,40±1,0
	0,25%	99,30±0,2
Cl-tionepafenak	0,01% (LOQ)	100,99±1,9
	0,10%	96,09±1,9
	0,25%	101,75±0,4
Tionepafenak	0,01% (LOQ)	102,20±1,2
	0,10%	98,32±1,1
	0,25%	98,42±0,2
Cl-nepafenak	0,01% (LOQ)	97,50±0,9
	0,10%	102,22±1,1
	0,25%	97,28±0,1
Hidroksi-nepafenak	0,01% (LOQ)	96,66±1,2
	0,10%	100,25±0,8
	0,25%	100,87±0,5
Ciklički nepafenak	0,01% (LOQ)	98,15±1,1
	0,10%	102,20±0,2
	0,25%	100,17±0,6

Preciznost je raspršenost pojedinih mjerenja oko srednje vrijednosti dobivenih ponavljanim ispitivanjima**.** Kao dio preciznosti, razlikujemo ponovljivost, srednju preciznost i obnovljivost. Ponovljivost metode je provjerena injektiranjem 6 individualnih priprema otopine uzorka i standarda nepafenaka. Otopina uzorka nepafenaka je nacijepljena svim onečišćenjima na nivou 0,10%, u odnosu na nominalnu koncentraciju uzorka. %RSD površine pikova 2-aminobenzofenona, Cl-tionepafenaka, tionepafenaka, Cl-nepafenaka, hidroksi-nepafenaka i

cikličkog nepafenaka je izračunat za sve navedene komponente, i iznosio je manje od 5,0%, dok je za pik nepafenaka iznosio manje od 2,0%.

Srednja preciznost metode je ispitana korištenjem različitih kolona i instrumenata, različite pripreme otopina, u istom laboratoriju (Odjel istraživanja i razvoja, TAPI, Pliva Hrvatska) uz pomoć dva analitičara. Rezultati %RSD za srednju preciznost su unutar 5,0%, dok je %RSD za sve pikove onečišćenja također bio unutar 5,0%, potvrđujući preciznost metode (Tablica 11).

Preciznost je dodatno provjerena injektiranjem 6 individualno pripremljenih otopina na nivou kvantifikacije za sve pikove onečišćenja (2-aminobenzofenon, Cl-tionepafenak, tionepafenak, Cl-nepafenak, hidroksi-nepafenak i ciklički nepafenak). %RSD za površine pikova na nivou kvantifikacije iznosio je ispod 10,0% za sve komponente.

Obnovljivost je preciznost dobivena uspoređivanjem podataka dobivenih u različitim uvjetima rada (međulaboratorijska ispitivanja), što u slučaju UHPLC metode za ispitivanje kakvoće nepafenaka nije napravljeno.

Robusnost metode je provjera sposobnosti metode da ostane prikladna za namijenjenu upotrebu nakon uvođenja sitnih, namjernih varijacija. Eksperimentalni uvjeti metode su promijenjeni, te se provjeravao utjecaj navedenih varijacija na rezoluciju između pikova 2-aminobenzofenona, Cl-tionepafenaka, tionepafenaka, Cl-nepafenaka, hidroksi-nepafenaka i cikličkog nepafenaka. Protok mobilne faze je ispitan u rasponu 0,5 mL/min do 0,7 mL/min, te je provjeravano razlučivanje između pikova. Isto je provjeravano i nakon promjene temperature kućišta kolone (45°C do 55°C). Sastav mobilne faze je nepromijenjen. U oba slučaja, unesene varijacije nisu značajno utjecale na razlučivanje između pikova. Razlučivanje između susjednih pikova je bilo iznad 4,0, te potvrđuje robusnost metode.

Stabilnost je prosudba dopuštenog vremena između skupljanja uzorka i analize. Stabilnost otopina standarda i uzorka je ispitana ostavljanjem pripremljenih otopina koncentracije 1 µg/mL u začepljenim volumetrijskim tikvicama 6 sati na sobnoj temperaturi. U otopini uzorka nepafenaka je došlo do razgradnje i formiranja cikličkog nepafenaka. Razrijeđene otopine uzorka također se razgrađuju, uz ciklički nepafenak nastaje i razgradni produkt DP-1. Zbog navedenog, otopine nepafenaka je potrebno pripremiti i injektirati svježe prije same analize.

Razgradni produkt DP-1, s m/z vrijednosti od 256 [M+1] u ESI pozitivnom načinu ionizacije molekula, odgovara molekuli amfenaka, poznatog metabolita nepafenaka.

S obzirom na to da je nepafenak oftalmička otopina, prisutnost oba navedena onečišćenja je očekivana i u gotovom ljekovitom proizvodu.

4.6. Literaturno poznate kromatografske metode za nepafenak

Trenutno ne postoji nepafenak monografija u Europskoj farmakopeji (EP) i Američkoj farmakopeji (USP). Literaturno je dostupno samo nekoliko HPLC-PDA metoda za određivanje kakvoće nepafenaka, analizu aktivne farmaceutske supstancije ili nepafenaka u farmaceutskim formulacijama.

U patentnoj dokumentaciji navedena je reverzno fazna HPLC metoda za kvantifikaciju hidroksi-nepafenaka, koja odjeljuje samo 3 onečišćenja[20]. Korištena je kromatografska kolona Waters Sunfire C18, promjera čestica 5 µm i dimenzija kolone 4,6 x 150 mm, grijana na 30°C. Mobilna faza A je filtrirani 10 mM pufer amonijevog formijata, pH vrijednosti 4,25 podešene s mravljom kiselinom, dok je mobilna faza B acetonitril. Gradijentno eluiranje je navedeno u tablici 13.

Tablica 13. Prikaz gradijentnog eluiranje HPLC metode za određivanje nepafenaka iz patentne dokumentacije

Vrijeme (min)	B (%, v/v)
0 – 30,0	30
30,0 – 40,0	30 → 32
40,0 – 65,0	32

Valna duljina detekcije je podešena na 245 nm, protok mobilne faze je 1 mL/min. Kao otapalo je korišten acetonitril, volumen injektiranja je 10 µL. Koncentracija uzorka je 0,5 mg/mL. Ova metoda omogućava detekciju i odjeljivanje samo 3 onečišćenja (Tablica 14), uz dugotrajnu analizu od 65 minuta.

Tablica 14. RRT vrijednosti detektiranih onečišćenja

Analit	*RT (min)*	*RRT*
Nepafenak	10,1	/
Hidroksi-nepafenak	4,3	0,43
2-Amino-3-benzoyl-α-(methylthio)benzeneacetamide	21,3	2,11
2-aminobenzofenon	44,7	4,43

Nedavno objavljena metoda u *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* s *Pharmaceutical Research Institute* u Poljskoj omogućava kvantifikaciju sadržaja i onečišćenja aktivne farmaceutske supstancije nepafenaka[16]. Razvijena HPLC metoda je validirana prema zahtjevima ICH Q2(R1) vodiča za farmaceutsku industriju, te je provedena i studija prisilne razgradnje. Korištena kromatografska kolona je bila Gemini NX C18, promjera čestica 3 µm i dimenzija kolone 4,6 x 100 mm, podešena na 30°C. Kao mobilna faza A korišten je 10 mM pufer amonijevog formata, čiji je pH podešen na 4,1 $\pm$ 0,02 pomoću mravlje kiseline. Protok je 1,0 mL/min, a volumen injektiranja 10 µL. Kao otapalo je korištena smjesa vode i metanola u omjeru 1:9 (v/v), dok se detekcija onečišćenja provela snimanjem signala detektora na 245 nm, a za parameter sadržaja na 380 nm. Gradijentni program je naveden u tablici 15.

Tablica 15. Prikaz gradijentnog eluiranje HPLC metode razvijene na *Pharmaceutical Research Institute* u Poljskoj

Vrijeme (min)	*B (%, v/v)*
0	27
0,0 – 13,0	50
13,0 – 17,0	50
17,0 – 23,0	60
23,0 – 24,0	27
24,0 – 29,0	27

Metoda je dokazano linearna, precizna, točna, selektivna te robusna. Valna duljina detekcije na 380 nm je specifična valna duljina za određivanje sadržaja, jer je apsorpcija dovoljno niska da se uzorak za pripremu onečišćenja ne treba dodatno razrijediti za pripremu uzorka sadržaja te je omogućena kvantifikaciju oba parametra iz iste otopine uzorka. Jedini preduvjet je mogućnost detektora da prati dvije valne duljine paralelno. U usporedbi s metodom navedenoj u patentnoj dokumentaciji, razvijena metoda ima prednost zbog trajanja same analize i selektivnosti 8 potencijalnih onečišćenja. U rutinskom radu laboratorija kontrole kvalitete, velik broj uzoraka se svakodnevno analizira i vrijeme trajanja analize uz potrošnju otapala su važni segmenti analitičkog postupka. U tom smislu, razvijena UHPLC metoda predstavlja jednostavniju, bržu i ekonomičniju alternativu navedenoj HPLC metodi, kao i HPLC metodi iz patentne dokumentacije, te HPLC metodi razvijenoj u Pliva Hrvatska. UHPLC metode imaju značajne prednosti u vidu brzine, razlučivanja i osjetljivosti analize u usporedbi s HPLC tehnikom.

Metoda razvijena 2014. godine na Sveučilištu u Pakistanu[21] služi za kontrolu kakvoće nepafenaka kao aktivne farmaceutske supstancije i u obliku suspenzije kao farmaceutske formulacije. Ova reverzno fazna HPLC metoda koristi C18 kolonu, kao mobilna faza koristi se smjesa acetonitrila i vode u omjeru 40:60 (v/v), s protokom od 1 mL/min i snimanjem signala detektora na 254 nm te volumenom injektiranja od 20 µL. U članku se referencira ICH vodič za farmaceutsku industriju. Vrijeme zadržavanja nepafenaka je 7,5 min. Prema zaključcima članka, metoda se može koristiti za ispitivanje sadržaja i onečišćenja nepafenaka te za farmakokinetičke studije. Dovoljno je selektivna i reproducibilna, te separira sve pomoćne tvari od ispitivane komponente. Dokazana je linearnost, točnost, preciznost, robusnost, granice detekcije i kvantifikacije i stabilnost. Ovaj znanstveni članak ne navodi poznata onečišćenja niti pomoćne tvari te ne prilaže nijedan kromatogram kao potvrdu tvrdnje.

Iako je poznato da je nepafenak formuliran u gotov ljekoviti oblik isključivo kao oftalmička suspenzija, u članku objavljenom u *International Journal of Pharma and Bio Sciences*[22] obrađena je razvijena RP-HPLC metoda za određivanje sadržaja nepafenaka u tabletama i kapsulama te u uzorcima plazme. Metoda koristi C18 kromatografsku kolonu dimenzija 250 mm x 4,6 mm, promjera čestica 5 µm. Ostale značajke instrumentalnih parametara su izokratno eluiranje pokretne faze sastava metanol:acetonitril:tetrahidrofuran 50:40:10 (v/v), protok od 1 mL/min, volumen injektiranja 20 µL i detekcija na valnoj duljini od 238 nm. Vrijeme

zadržavanja nepafenaka je 3,3 min, a sveukupno trajanje jedne analize je 6 min. Prema zaključcima znanstvenog članka, metoda je validirana prema ICH vodiču u vidu specifičnosti, linearnosti, točnosti preciznosti, robusnosti, a dokazane su granice kvantifikacije i detekcije mada je riječ samo o parametru sadržaja, a ne onečišćenja. Metoda je prikladna i za kvantifikaciju sadržaja u krvnoj plazmi. Prema navodima autora, metoda je sposobna odvojiti pik komponente od ostalih pikova, ali daljnje studije su potrebne da bi se procijenila stabilnost u farmaceutskim formulacijama.

Analiza određivanja udjela ostatnih otapala u aktivnoj farmaceutskoj supstanciji provodi se najčešće korištenjem tehnike plinske kromatografije. U patentnoj dokumentaciji[23] analiza se provela korištenjem plinskog kromatografa s FID detektorom, autosamplerom i kromatografske kolone TRB-5. Glavni nedostatak ove metode je dugotrajno vrijeme analize.

Nedavno objavljen rad u *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* s *Pharmaceutical Research Institute*[24] u Poljskoj prikazuje metode određivanja ostatnih otapala u nepafenaku uz pomoć tehnike uzorkovanja para iznad otopine i plinske kromatografije (GC-HS) te tehnike direktnog injektiranja i plinske kromatografije (GC-ALS). Metode su validirane prema uvjetima preuzetim iz ICH Q2 (R1) i Q3C, i uključuju potpunu validaciju metode I (GC-HS metoda za određivanje ostatnih otapala klase III (aceton, izopropanol)), te djelomičnu validaciju metode II (GC-HS metoda za određivanje ostatnih otapala klase II (diklormetan, metanol, toluen)), metode III (GC-HS metoda za određivanje ostatnog otapala klase I benzena), metode IV (GC metoda s direktnim injektiranjem (GC-ALS) za određivanje ostatnog otapala trietilamina), metode V (GC metoda s direktnim injektiranjem (GC-ALS) za određivanje udjela sirovine 2-(metiltio)acetamida), te metode VI (GC metoda s direktnim injektiranjem (GC-ALS) za određivanje kvalitete sirovine 2-(metiltio)acetamida). U metodama I, II, III i IV korištena je kolona DB-624 dimenzija 60 m x 0,32 mm, debljine filma 1,8 µm, dok je u metodama V i VI korištena kolona DB-5 dimenzija 30 m x 0,32 mm, debljine filma 1,0 µm. Metoda I za kvantitativno određivanje acetona i izopropanola je dokazano selektivna, linearna, precizna, točna, robusna, a određene su granice detekcije i kvantifikacije te prikladnost sustava. Metoda II za određivanje udjela metanola, diklormetana i toluena je limit test, dokazane selektivnosti, granice detekcije i preciznosti sustava. Limit test metoda III za određivanje benzena koji se ne koristi prilikom sinteze, ali je poznati kontaminant toluena i acetona je selektivna, precizna te je određena i granica detekcije. Metodama IV i V koji su

također limit testovi je dokazana selektivnost, preciznost i granica detekcije. Metoda VI za određivanja kromatografske čistoće sirovine 2-(metiltio)acetamida je selektivna, linearna, utvrđene granice detekcije. Rezultati svih parametara validacije su zadovoljavajući, a navedene se GC-HS i GC-ALS metode mogu koristiti za rutinski rad prilikom određivanja kontrole kakvoće aktivne farmaceutske supstancije nepafenaka.

GC-HS metoda razvijena u Pliva Hrvatska za određivanje ostatnih otapala (aceton, izopropanol, diklormetan, tert-butanol i heptan) u nepafenaku koristi kromatografsku kolonu Phenomenex Zebron 624, dimenzija 30 m x 0,53 mm, debljine filma 3 µm. Trajanje jedne analize je 31 minuta, dok je vrijeme inkubacije 15 minuta, a kao otapalo korišten je N,N-dimetilacetamid. Kao dio prikladnosti sustava injektiraju se otopine granica kvantifikacije, a treba biti zadovoljen zahtjev za omjer signala i šuma minimalno 10 za sve pikove specificiranih otapala, i otopine standarda, prilikom čega zahtjevi za razlučivanje između pikova i %RSD faktora odgovora trebaju biti zadovoljeni. Metoda je validirana prema ICH vodiču za farmaceutsku industriju, a dokazano je selektivna, linearna, precizna, točna, robusna, određene su granice detekcije i kvantifikacije, stabilnost otopina i radno područje.

5. ZAKLJUČAK

Analitičke metode su kritičan element životnog ciklusa farmaceutskog proizvoda, upravo zbog njihove uloge u razvoju i kontroli kakvoće proizvoda. Neadekvatno razvijene analitičke metode mogu dovesti do nepouzdanih rezultata koji mogu biti ključni za daljnji razvoj proizvoda[25]. ICH vodič za industriju i povezana farmakopejska poglavlja, primjerice USP <1225> Validacija analitičkih metoda, daju osnovne smjernice prilikom validacije metode, pri čemu se oslanjaju na statističke potvrde valjanosti rezultata prilikom validacije parametara kao što su točnost, preciznost, specifičnost, linearnost, radno područje, granice detekcije i kvantifikacije. Ključni parametri validacije koji pružaju uvid funkcionalnosti metode prilikom rutinske upotrebe i procjenjuju utjecaj kritičnih analitičkih faktora su robusnost i izdržljivost metode[26].

Stabilnost aktivne farmaceutske supstancije i gotovog ljekovitog oblika tijekom životnog ciklusa proizvoda postavljeni su važni zahtjevi u kontroli kakvoće. Stabilitetno-indikativne analitičke metode za kvantifikaciju aktivne komponente i onečišćenja moraju biti razvijene i validirane. Podaci stabilitetnih ispitivanja su važni za uspostavljanje kontrolnih granica prilikom obrade rezultata, te omogućavaju predviđanje OOS rezultata.

Eksperimentalni dio ovog rada je obuhvatio razvoj i validaciju stabilitetno-indikativne RP-UHPLC s UV detekcijom metode za ispitivanje kontrole kakvoće aktivne farmaceutske supstancije. Postignuta je visoka osjetljivost i zadovoljavajuća separacija u trajanju jedne analize od samo 10 minuta. Prilikom validacije izvršena je studija prisilne razgradnje, a značajna je razgradnja zabilježena pri kiseloj i bazičnoj hidrolizi te oksidaciji. Određena je struktura glavnih onečišćenja korištenjem LC-MS/MS tehnike.

Razvijena UHPLC metoda ima prednosti nad ostalim literaturno poznatim HPLC tehnikama određivanja kvalitete nepafenaka upravo zbog kraćeg trajanja vremena analize i smanjene potrošnje otapala i resursa. U usporedbi s HPLC metodom razvijenom u Pliva Hrvatska, UHPLC metoda je bolji izbor upravo zbog brzine, osjetljivosti i zadovoljavajuće selektivnosti.

Industrija je prepoznala potrebu razvoja analitičkih metoda koje pružaju potpuno razumijevanje svrhe postupaka kontrole i dizajniranja smislenog ispitivanja prikladnosti sustava. Potpuno razumijevanje namjene metode znači poznavanje molekule, njenih

onečišćenja i puteva razgradnje, osjetljivosti na razne čimbenike, uvjeta skladištenja, poželjan rok valjanosti te u konačnici kritične atribute kvalitete. Razvoj analitičke metodologije treba predstavljati ugradnju kvalitete u proizvod od samog početka.

6. LITERATURA

1. S.J. Kim, A.J. Flach, L.M. Jampol. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in ophthalmology. Surv. Ophthalmol. 55 (2010) 108–133.
2. International Conference on Harmonization (ICH). Stability Testing of new drug substances and products. Q1A (R2). IFPMA, Geneva, 2003.
3. D.W. Reynolds, K.L. Facchine, J.F. Mullaney, i sur. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. Pharm. Technol. 26 (2) (2002); 48–56.
4. Jain D, Basniwal PK. Forced degradation and impurity profiling: Recent trends in analytical perspectives. J Pharm Biomed Anal. 2013; 86: 11–35.
5. International Conference on Harmonization (ICH) 2006 Impurities in new drug substances Q3A (R2).
6. International Conference on Harmonization (ICH) 2006 Impurities in new drug products Q3B (R2).
7. The United States Pharmacopeia USP 37 <1086> Impurities in Drug Substances and Drug Products; 828.
8. Blessy M, Patel RD, Prajapati PN, Agrawal Y. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs- a review. J Pharm Anal 2014; 4:159-165.
9. Maheswaran R. Scientific Considerations of Forced degradation Studies in ANDA Submissions, Journal of Validation Technology 2012; 92-96.
10. Shein-Chung Chow, Statistical Design and Analysis of Stability Studies, Chapman and Hall, 2007, str 18.
11. Ranjit S, Rehman Z, Current trends in forced degradation study for pharmaceutical product development. Journal of pharmaceutical and educational research 2012; 2:54-63.
12. Cindrić M, Marković A, Horvać A: Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: Osnove metodologije i primjene. medicina 2009, Vol. 45, No. 3, str. 218-232. Dostupno na: *hrcak.srce.hr/file/68074.*
13. International Conference on Harmonization 2006 ICH guideline Q3C (R5) on impurities: guideline for residual solvents.
14. Scientific discussion – nepafenac, European Medicines Agency (EMA), European public assessment reports (EPAR), Jun, 2015). Dostupno na: *http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/ document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000818/WC500027155.pdf.*
15. Runje M, Babić S, Meštrović E, i sur. Forced degradation of nepafenac: development and validation of stability indicating UHPLC method, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2016, 123:42-52.
16. Lipiec-Abramska E, Jedynak Ł, Formela A, i sur. Development and validation of high performance liquid chromatography with a spectrophotometric detection method for the chemical purity and assay of Nepafenac, J. Pharm. Biomed. Anal. 91 (2014) 1-6.
17. Ke T.L., Graff G, J, Spellman M. i sur. Nepafenac, a unique nonsteroidal prodrug with potential utility in the treatment of trauma-induced ocular inflammation: II. In vitro bioactivation and permeation of external ocular barriers, Inflammation 24 (2000) 371– 384.
18. International Union of Pure and Applied Chemistry. IUPAC recommendations 2001: Selectivity in analytical chemistry. Pure Appl. Chem., Vol 73:8;1381-1386.

19. Waters, Empower PDA software: Getting started guide; Revision A; str 76.

20. Ana Gavalda Escude. 2-{2-amino-3-[hydroxy(phenyl)methyl]phenyl} acetamide, Pat. No. WO 2010/115906 A1, October 14, 2010.

21. Shahnaz Usman, Muhammad Akram, Asif Aziz i sur. Development and validation of HPLC analytical method for Nepafenac in ophthalmic dosage form (suspension). Pak. J. Pharm. Sci., Vol.27, No.5 (Special), September 2014;1541-1546.

22. Phani Kumar V, Sunandamma Y. A novel RP-HPLC method for the quantification of nepafenac in formulation, plasma (in vitro). Int J Pharm Bio Sci 2012 Oct; 3(4); 849 - 856.

23. Gabriel Tojo Suarez, Ana Gavalda Escude. Process for preparing a benzoylbenzeneacetamide derivative, Pat no US 20090312575 A1, December 17, 2009.

24. Mucha M, Groman A, Zagrodzka J. i sur. Determination of organic volatile impurities in nepafenac by GC method. Acta Poloniae Pharmaceutica- Drug Research, Vol. 71 No. 6 str. 1013-1022, 2014.

25. Jianmei Kochling, Wei Wu, Yimin Hua, i sur. A platform analytical quality by design (AQbD) approach for multiple UHPLC-UV and UHPLC–MS methods development for protein analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 125 (2016); 130–139.

26. Elder D.P, Borman P. Improving Analytical Method Reliability Across the Entire Product Lifecycle Using QbD Approaches. Dostupno na: *http://www.pharmoutsourcing.com/Featured-Articles/142484.*

7. KRATICE

Kratica	Engleski jezik	Hrvatski jezik
API	Active Pharmaceutical Ingredient	Aktivna farmaceutska supstancija
ALS	Automatic Liquid Sampler	Sampler s direktnim injektiranjem
BCS	Biopharmaceutics Classification System	Biofarmaceutski klasifikacijski sustav
CI	Chemical Ionization	Kemijska ionizacija
DAD	Diode Array Detector	Detektor s diodnim nizom
EI	Electron ionization	Elektronska ionizacija
EP	European Pharmacopoeia	Europska farmakopeja
ESI	Electrospray Ionization	Elektrosprej ionizacija
FAB/FIB	Fast atom/ion bombardment	Ionizacija brzim atomima/ionima
FDA	Food and Drug Administration	Američka agencija za hranu i lijekove
FID	Flame Ionization Detector	Plameno-ionizacijski detektor
GC	Gas Chromatography	Plinska kromatografija
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
HS	Head Space	Tehnika uzorkovanja para iznad otopine
ICH	International Conference on Harmonization	Međunarodna konferencija o harmonizaciji
LOD	Limit of Detection	Granica detekcije
LOQ	Limit of Quantification	Granica kvantifikacije

Kratica	Engleski jezik	Hrvatski jezik
MALDI	Matrix assisted laser desorption/ionization	Matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija
MS	Mass spectrometry	Masena spektrometrija
NSAID	Nonsteroidal anti-inflammatory drug	Nesteroidni antiupalni lijekovi
OOS	Out of Specification	Rezultat van specifikacije
PDA	Photodiode Array Detector	Detektor s diodnim nizom
QQQ	Triple Quadrupol	Trostruki kvadrupol
RI	Refractive Index	Indeks refrakcije
RRT	Relative Retention Time	Relativno vrijeme zadržavanja
RSD	Relative Standard Deviation	Relativna standardna devijacija
R&D	Research and Development	Istraživanje i razvoj
SIM	Stability indicating method	Stabilitetno-indikativna metoda
UHPLC	Ultra High Pressure Liquid Chromatography	Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti
USP	United States Pharmacopoeia	Američka farmakopeja
UV	Ultraviolet	Ultraljubičasto
VIS	Visible	Vidljivo