Razvoj stabilitetno indikativne kapilarnoelektroforetske metode za analizu febuksostata

Engler, Nera

Master's thesis / Diplomski rad

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:163:674772

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Nera Engler

Razvoj stabilitetno indikativne kapilarnoelektroforetske metode za analizu febuksostata

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Mirande Sertić.

Zahvaljujem se svojoj dragoj mentorici doc.dr.sc. Mirandi Sertić na svakoj minuti provedenoj sa mnom u laboratoriju, na strpljenju, razumijevanju i pristupačnosti te na vraćanju osmijeha na moje lice neovisno o situaciji.

Zahvaljujem se i svojim prijateljima, koji ispunjavaju moj život veseljem.

Najveća zahvala ide mojim roditeljima – hvala vam na bezuvjetnoj ljubavi i podršci koju mi pružate. Želim da budete ponosni na mene.

Rad posvećujem majci, mom najvećem akademskom i životnom uzoru.

SADRŽAJ:

1. UVOD 1
1.1.FEBUKSOSTAT KAO NOVI LIJEK PROTIV GIHTA 1
1.2.ISPITIVANJE STABILNOSTI LIJEKOVA 2
1.2.1. Smjernice regulatornih organizacija za provođenje ispitivanja stabilnosti lijekova 2
1.2.2. Stabilitetno indikativne metode 3
1.2.3. Studije prisilne razgradnje (stres studije) 4
1.3. KAPILARNA ELEKTROFOREZA 8
1.3.1. Micelarna elektrokinetička kromatografija 10
2.OBRAZLOŽENJE RADA 12
3. MATERIJAL I METODE 13
3.1. MATERIJALI 13
3.1.1. Kemikalije 13
3.1.2. Radni instrumenti 14
3.1.3. Pribor 14
3.1.4. Programski paketi 14
3.2. METODE 15
3.2.1. Priprema standardnih otopina 15
3.2.2. Ekstrakcija febuksostata iz komercijalno dostupne tablete 15
3.2.3. Priprema radnog pufera 15
3.2.4. Priprema instrumenta 16
3.2.5. Analiza uzorka 16
4. REZULTATI I RASPRAVA 17
4.1. ODABIR RADNOG PUFERA 18
4.2. EKSTRAKCIJA FEBUKSOSTATA IZ TABLETE 20
4.3. ODABIR UNUTARNJEG STANDARDA 21
4.4. UTJECAJ RAZLIČITIH KONCENTRACIJA KLOROVODIČNE KISELINE NA RAZGRADNJU FEBUKSOSTATA 27
5. ZAKLJUČCI 30
6. POPIS LITERATURE 31
7. SAŽETAK/SUMMARY 34
7.1. SAŽETAK 34
7.2. SUMMARY 35

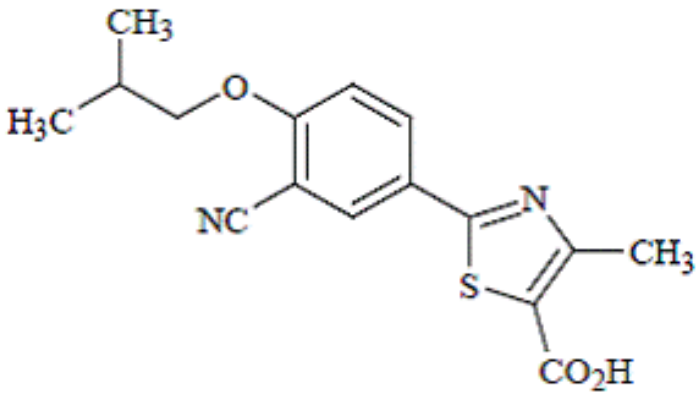
1. UVOD

1.1. FEBUKSOSTAT KAO NOVI LIJEK PROTIV GIHTA

Giht je jedna od najčešćih metaboličkih upalnih bolesti. Poznata je još od davnih vremena, kada se smatrala „bolešću kraljeva“ zbog povezanosti s pretjeranim uživanjem alkohola i hrane bogate proteinima (crveno meso). Giht nastaje zbog povećanog odlaganja kristala mokraćne kiseline (urata) u različite dijelove tijela, te se manifestira kao urični artritis (odlaganje kristala u zglobove, hrskavice i tetive) ili urični nefritis (odlaganje kristala urata u bubrege). Do odlaganja kristala mokraćne kiseline dolazi kada njezina koncentracija u krvi prelazi 6,8 mg/dL. Takvo stanje nazivamo hiperuricemija (Garcia Valladares i sur, 2011).

Jedan od načina sprječavanja hiperuricemije jest primjena inhibitora ksantin oksidaze, enzima koji dovodi do stvaranja mokraćne kiseline. Za razliku od dosad najčešće korištenog alopurinola, febuksostat se pokazao kao potentniji i nekompetitivni inhibitor ksantin oksidaze te posebno uspješan kod pacijenata s oštećenom funkcijom bubrega (Edwards, 2009).

Febuksostat, 2-[3-cijano-4-(2-metilpropoksi)fenil]-4-metiltiazol-5-karboksilna kiselina (Slika 1), relativno je nov lijek, u Republici Hrvatskoj registriran od 2012. godine. To je nehigroskopan bijeli kristalinični prašak, praktički netopljiv u vodi (Mukthinuthalapati i sur, 2013). Slaba je kiselina s pKa u iznosu od 3,42 te je u lužnatom mediju negativno nabijen. Iako je dobio odobrenje Američke agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) i Europske medicinske agencije (engl. *European Medicine Agency*, EMA), nije opisan niti u jednoj Farmakopeji (Dalmora i sur, 2014).



Slika 1. Kemijska struktura febuksostata

1.2. ISPITIVANJE STABILNOSTI LIJEKOVA

Stabilnost farmaceutskog proizvoda ili ljekovite tvari kritični je parametar koji može utjecati na čistoću, potentnost i sigurnost lijeka. Budući da promjene u stabilnosti lijeka, kao što su formiranje toksičnih razgradnih produkata ili dostava manje doze nego što je očekivano, mogu dovesti u rizik pacijentovu sigurnost, nužno je poznavati utjecaj različitih okolišnih čimbenika na ljekovitu tvar (Brummer, 2011). Znanje o stabilnosti tvari pomaže pri definiranju uvjeta skladištenja te u odabiru formulacije i pakiranja, što je od iznimne važnosti za regulatornu dokumentaciju.

Prije razvoja formulacije gotovog proizvoda provode se ispitivanja stabilnosti djelatne tvari da bi se odredile njezine karakteristike, uključujući i određivanje profila čistoće tj. određivanja onečišćenja (Nigović i Sertić, 2012). Na temelju svojstava djelatne tvari i pomoćnih tvari te njihovih međusobnih interakcija odabire se najbolji put primjene te najbolji ljekoviti oblik, koji se kao takav također podvrgava ispitivanjima stabilnosti kako bi se utvrdili uvjeti čuvanja te predvidila dugoročna stabilnost pri takvim uvjetima čuvanja (Jalžabetić, 2016).

1.2.1. Smjernice regulatornih organizacija za provođenje ispitivanja stabilnosti lijekova

International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) jest međunarodno regulatorno tijelo koje objedinjuje regulatorna tijela Sjedinjenih Američkih Država (FDA), EU (EMA) i Japana (engl. *The Pharmaceuticals and Medical Devices Agency*, PMDA) te stručnjake iz farmaceutske industrije. To je jedinstveni projekt čija je misija postići globalnu harmonizaciju kako bi se osigurao razvoj i registracija sigurnih, efektivnih i visoko kvalitetnih lijekova i medicinskih proizvoda (www.ich.org).

ICH smjernice naglašavaju važnost ispitivanja onih svojstava djelatne tvari koja su podložna promjenama tijekom skladištenja, a koja bi mogla utjecati na kvalitetu, sigurnost i efikasnost lijeka. Također, od iznimne su važnosti dokumentirani dokazi da su korištene analitičke metode validirane i prikladne za određivanje i kvantifikaciju razgradnih produkata djelatne tvari (ICH Q1A – Q1F).

1.2.2. Stabilitetno indikativne metode

Metode koje se koriste tijekom ispitivanja stabilnosti lijekova nazivaju se stabilitetno indikativne metode (SIM). Prema FDA, stabilitetno indikativna metoda jest validirani analitički postupak koji točno i precizno mjeri djelatnu tvar, bez utjecaja procesnih onečišćenja, pomoćnih tvari i razgradnih produkata. Glavni cilj stabilitetno indikativnih metoda je pratiti rezultate tijekom stabilitetnih studija kako bi se mogla garantirati sigurnost, efikasnost i kvaliteta gotovog farmaceutskog proizvoda (Cione i sur, 2011).

Razvoj stabilitetno indikativne metode nije precizno objašnjen niti u regulatornim smjernicama, niti u farmakopejama, no prema Bakshi i Singh (2002), uključuje sljedeće korake:

1) studija strukture djelatne tvari u svrhu utvrđivanja najvjerojatnijeg puta razgradnje;
2) prikupljanje informacija o fizikalno-kemijskim svojstvima djelatne tvari;
3) studije prisilne razgradnje (stres studije);
4) preliminarne separacijske studije na uzorcima iz stres studija;
5) konačni razvoj i optimizacija metode;
6) identifikacija i karakterizacija razgradnih produkata te priprema standarda;
7) validacija stabilitetno indikativne metode.

Kromatografske separacijske tehnike pokazale su se kao najbolje za separaciju komponenti tijekom stabilitetnih studija, s mnogim prednostima koje uključuju iznimnu točnost i osjetljivost i kod malih količina potencijalno nastalih degradacijskih produkata. Najviše je stabilitetno indikativnih metoda razvijeno koristeći tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (engl. *High Pressure Liquid Chromatography*, HPLC). Kapilarna elektroforeza (engl. *Capillary Electrophoresis*, CE) jedna je od novijih tehnika korištenih za razvoj stabilitetno indikativnih metoda. Njena prednost leži u visokoj osjetljivosti i razlučivosti uz minimalno širenje pikova (Bakshi i Singh, 2002).

1.2.3. Studije prisilne razgradnje (stres studije)

Kao pomoć u određivanju stabilnosti, provode se studije prisilne razgradnje, odnosno stres studije. Prisilna razgradnja je proces koji uključuje degradaciju ljekovitih supstancija u agresivnijim uvjetima od uvjeta korištenih u studijama ubrzane razgradnje[1], pri čemu dolazi do nastajanja razgradnih produkata koji se mogu proučavati u svrhu utvrđivanja stabilnosti same ljekovite tvari. Ti razgradni produkti mogu ili ne moraju nastati unutar relevantnih uvjeta skladištenja gotovog proizvoda, no od važnosti su prilikom razvoja stabilitetno indikativne metode (Blessy i sur, 2013).

Studije prisilne razgradnje, prema Brummer (2011), vrše se iz sljedećih razloga:

- utvrđivanje razgradnog puta djelatne tvari;
- identifikacija onečišćenja vezanih za djelatnu tvar ili ekscipijense;
- razumijevanje kemijskih karakteristika same djelatne tvari;
- stvaranje degradacijskog profila koji oponaša ono što bi se proučavalo u formalnoj studiji ispitivanja stabilnosti pod ICH uvjetima;
- rješavanje problema vezanih za stabilnost.

Tipične studije prisilne razgradnje obuhvaćaju hidrolitičku razgradnju (pod utjecajem kiseline ili baze), oksidativnu razgradnju, termorazgradnju i fotolitičku razgradnju. Jačina stresnih uvjeta može varirati ovisno o kemijskoj strukturi djelatne tvari, farmaceutskom obliku i posebnim uvjetima za skladištenje gotovog farmaceutskog proizvoda (Brummer, 2011).

Regulatorne agencije predlažu početak studija prisilne razgradnje u ranoj fazi razvoja novog farmaceutskog proizvoda, pretkliničkoj ili kliničkoj fazi, kako bi se što ranije identificirali razgradni produkti te kako bi se optimizirao i poboljšao proces proizvodnje (Kumar i sur, 2013).

Dokument *Stability Testing of New Drug Substances and Products, Q1A (R2)* (ICH Q1A (R2)) predlaže uvjete za provođenje stres studija na djelatnim tvarima i gotovim farmaceutskim proizvodima. Tablica 1 prikazuje primjer uvjeta u studijama forsirane

[1]Studije ubrzane razgradnje dizajnirane su tako da ubrzaju kemijsku razgradnju ili fizikalne promjene primjenom pretjeranih uvjeta čuvanja, kako se ne bi moralo čekati na podatke o stabilnosti djelatne tvari ili gotovog proizvoda na sobnoj temperaturi, pri čemu dolazi do nastajanja razgradnih produkata koji se mogu proučavati u svrhu utvrđivanja stabilnosti same ljekovite tvari. Provode se na temperaturi od 40 °C±2 °C, na 75%±5% RV u trajanju od 6 mjeseci (Shete i sur, 2014).

razgradnje na djelatnim tvarima (Cione i sur, 2011). Sugerira se ispitivanje utjecaja temperature u povećanjima od 10 °C iznad temperature primijenjene u testovima ubrzane razgradnje (50 °C, 60 °C itd.) i vlage (75% ili više). No, smjernice ne propisuju uvjete koji bi se odnosili za studije oksidacije, fotolize ili hidrolize. Bez službenog vodiča, pred analitičare se postavlja izazov samostalne odluke o uvjetima forsirane razgradnje (Singh i Bakshi, 2000).

Prema smjernicama Q1A i Q1B (ICH Q1A (R2) i ICH Q1B), neki od razgradnih produkata koji nastaju unutar stres ispitivanja ustvari ne nastaju i unutar formalnih studija ispitivanja stabilnosti. U tom slučaju, nije potrebno daljnje proučavanje tih produkata.

DJELATNA TVAR U KRUTOM STANJU			
Stres	**Uvjeti**		**Vremenski period**
zagrijavanje	60 °C		do 30 dana
vlažnost	75% relativna vlažnost		do 30 dana
fotostabilnost	3 mm (prašak) izloženi i neizloženi uzorci „kontrolni“		slijediti ICH (Q1B) smjernice
DJELATNA TVAR U OBLIKU OTOPINE			
Stres	**Uvjeti**		**Vremenski period**
hidroliza	**kisela**	0,1 – 1 M HCl	do nekoliko tjedana pri 60 °C
	alkalna	0,1 – 1 M NaOH	do nekoliko tjedana pri 60 °C
oksidacija	3% H_2O_2		do 24 h
fotostabilnost	izloženi i neizloženi uzorci („kontrolni“)		slijediti ICH (Q1B) smjernice
zagrijavanje	60 °C		do 30 dana

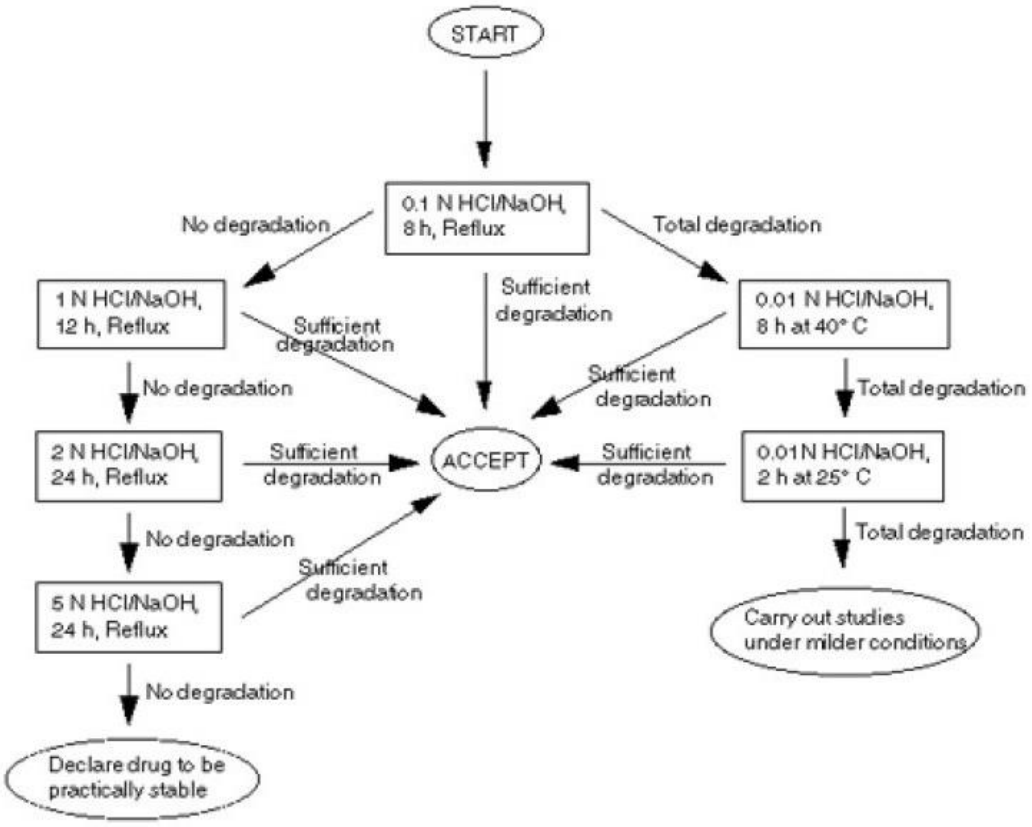
Tablica 1. Primjer uvjeta u studijama forsirane razgradnje na djelatnim tvarima (prema Cione, Tonhi i Silva, 2011).

Studije prisilne razgradnje trebale bi trajati onoliko koliko je potrebno da se postigne degradacija od 5-20%. Kako bi se brže razvila metoda, moguća je primjena viših temperatura od navedenih te kraće vrijeme izlaganja, no tome treba pristupati s oprezom, kako ne bi došlo do različitih kinetika razgradnje i nevažnih razgradnih produkata. Također, kraće vrijeme izlaganja trebalo bi se izbjegavati kako bi se zadržala realistična termodinamika. Produženo izlaganje bi se trebalo razmotriti jedino ako se tijekom 3 mjeseca nije postigla nikakva degradacija (Klick i sur, 2005).

1.1.3.1. Uvjeti hidrolitičke razgradnje djelatne tvari kiselinom

Budući da su kemijski procesi često katalizirani prisutstvom kiseline, izlaganje djelatne tvari takvim uvjetima može ubrzati reakciju razgradnje. Stres ispitivanje utjecaja kiseline na djelatnu tvar vrši se kako bi se forsirala razgradnja na primarne razgradne produkte. Hidroliza je jedna od najčešćih razgradnih kemijskih reakcija u širokom pH području. To je solvolitički (disocijacijski) proces u kojem tvar reagira s vodom uz nastajanje različitih novih kemijskih entiteta. Tvari koje u svojoj strukturi sadrže labilne karbonilne skupine kao što su amidi (laktami), esteri (laktoni), karbamati, imidi, imini, alkoholi te arilniamini, skloni su hidrolizi uz prisutnost kiseline (Shete i sur, 2014).

Najčešće korištena kiselina u ispitivanjima forsirane razgradnje jest klorovodična kiselina (HCl). U praksi se uglavnom kreće s ispitivanjem utjecaja 0,1 M HCl na razgradnju djelatne tvari, tijekom nekoliko sati uz refluks. Ukoliko se u tim uvjetima ne dogodi nikakva degradacija, tvar bi trebalo izložiti jačim koncentracijama kiseline u duljem trajanju. S druge strane, ako bi uz prve uvjete došlo do prevelike ili potpune degradacije, može se smanjiti koncentracija kiseline, kao i trajanje same reakcije (Slika 2).



Slika 2. Flow-chart za uvjete kisele razgradnje djelatne tvari (prema Singh i Bakshi, 2000).

Zbog iznimnih strukturnih različitosti djelatnih tvari u ljekovitim proizvodima, nije moguće definirati generički set uvjeta za bilo koju studiju forsirane razgradnje, pa tako ni one koja se odnosi na hidrolitičku razgradnju kiselinom (Kumar i sur, 2013). Uzmemo li u obzir sam febuksostat, brojni su radovi objavljeni na temu studija prisilne razgradnje, uz različite uređaje korištene za analizu i različite uvjete. Presjek nekoliko studija i usporedba uvjeta za hidrolitičku razgradnju kiselinom prikazani su u Tablici 2. Ono što je zajedničko svim metodama jest korištenje separacijskih analitičkih tehnika - tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti ili kapilarna elektroforeza. Kapilarna elektroforeza je elektroforetska separacijska tehnika, no zbog mnogih zajedničkih obilježja, gotovo se uvijek svrstava u skupinu kromatografskih separacijskih tehnika, iako ne zadovoljava preduvjet kromatografskog sustava, a to je separacija na principu razdvajanja između dvije faze (Sertić, 2016).

TEHNIKA	**γ (febuksostat) / mg mL^{-1}**	**c (HCl) / mol L^{-1}**	**t**	**T / °C**	**λ / nm**	**REFERENCA**
RP-HPLC	1	1	30 min	80	254	Mukthinuthalapati i sur, 2012.
RP-HPLC	1	0,1	90 min	25	315	Rajyalakshmi i sur, 2013.
RP-HPLC	15	0,1	48 h	25	218	Sekhar Reddy i sur, 2013.
RP-HPLC	0,1	0,1	6 h	60	315	Mandle i sur, 2013.
CE (MEKC)	0,4	1	60 min	100	216	Dalmora i sur, 2014.

Tablica 2. Usporedba različitih uvjeta za stres studiju razgradnje febuksostata kiselinom.

1.3. KAPILARNA ELEKTROFOREZA

Kapilarna elektroforeza (CE) je separacijska analitička tehnika koja se temelji na principu elektroforeze, odnosno činjenici da nabijene čestice u otopini elektrolita pod utjecajem električnog polja putuju različitim brzinama prema jednoj od elektroda (ne zaboravi ubaciti referencu). U kapilarnoj elektroforezi, nabijene čestice putuju u uskoj termostatiranoj kapilari, duljine 50-100 cm i širine 50-500 μm, pod djelovanjem električnog polja visokog potencijala. Uzorak se u kapilaru injektira pod tlakom, a krajevi kapilare uronjeni su u otopinu pufera. Kao detektor najčešće se koristi detektor s nizom dioda (engl. *Diode Array Detector*, DAD).

Brza i jednostavna, kapilarna elektroforeza je u analitici lijekova često korištena za određivanje sadržaja djelatnih tvari u svim vrstama ljekovitih oblika. Koristi se i za određivanje profila čistoće lijekova, pri analizi lijekova i njihovih metabolita u biološkim tekućinama i tkivima, u analizi peptida i proteina, a djelotvorna je i u odjeljivanju entantiomera (Sertić, 2016). Prednosti kapilarne elektroforeze uključuju i kratko vrijeme analize, ekološku prihvatljivost, male volumene uzoraka i otapala te pristupačnu cijenu.

Razdvajanje analita temelji se na razlici u brzini putovanja nabijenih čestica pod utjecajem električnog polja unutar kapilare. Brzinu kretanja čestice opisuje formula:

$$v = \mu_e E$$

gdje je v brzina putovanja, μ_e označava elektroforetsku pokretljivost, a E jakost primijenjenog električnog polja. Jakost električnog polja ovisi o duljini kapilare te primijenjenom naponu, prema izrazu:

$$E = V/L$$

gdje je V primijenjeni napon u voltima, a L duljina kapilare u centimetrima. Elektroforetska pokretljivost čestice definira se prema sljedećoj formuli:

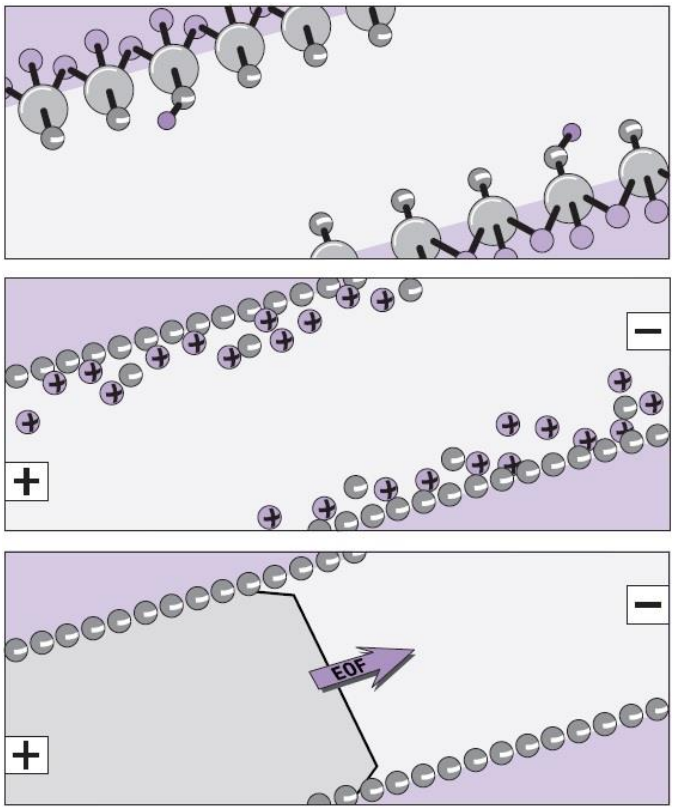
$$\mu_e = q/6\pi\eta r$$

gdje q označava naboj čestice, r je polumjer čestice, tj. Stokesov polumjer, a η viskoznost otopine elektrolita.

Brzina različitih analita ovisna je o njihovim svojstvima, kao i o duljini kapilare te primijenjenom naponu. Analit će se kretati brže što je naboj čestice veći, a polumjer manji.

Također, brzina je proporcionalna jakosti električnog polja, odnosno naponu, a obrnuto proporcionalna duljini kapilare. Na brzinu putovanja utječe i pKa vrijednost same molekule te pH pufera (Watson, 1999).

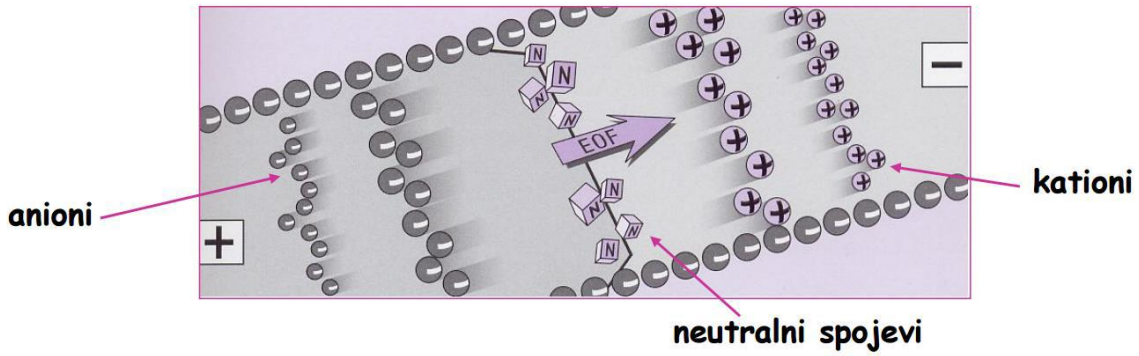
Još jedna od karakteristika kapilarne elektroforeze jest elektroosmotski tok (engl. *Electroosmotic flow*, EOF), koji nastaje kao posljedica površinskog naboja na unutrašnjoj stijenci kapilare, gdje se nalaze silanolne skupine. Naime, negativno nabijene silanolne skupine privlače katione iz otopine elektrolita koja se nalazi u kapilari i nastaje električni dvosloj (sastavljen od čvrstog dijela i difuzijskog dijela) te se uspostavlja elektroosmotski tok prema katodi (Slika 3). Kationi svojim kretanjem povlače za sobom i okolnu tekućinu, zbog čega dolazi do protoka cijele otopine prema katodi, te će se tako, na temelju elektroosmotskog toga, i neutralne čestice uzorka kretati kapilarom.



Slika 3. Uspostavljanje elektroosmotskog toka (Lauer i Rozing, 2009)

S obzirom na to da je sila koja pokreće tok jednoliko raspoređena cijelom dužinom kapilare, ne dolazi do pada tlaka unutar kapilare, što tok čini gotovo uniformim i dovodi do značajno manje disperzije zona analita, odnosno do užih i oštrijih pikova nego što je slučaj kod primjerice, tekućinske kromatografije gdje se stvara laminarni (parabolni) tok.

Elektroosmotski tok uzrokuje kretanje svih čestica u uzorku u istom smjeru, neovisno o naboju, jer je veličina EOF puno veća od elektroforetske pokretljivosti aniona, koji bi se zbog svog negativnog naboja trebali kretati prema pozitivnoj anodi. Slika 4 prikazuje slučaj gdje se u uzorku nalaze anioni, kationi i neutralne čestice. Vidljivo je da će se prema katodi najbrže kretati kationi, koje, osim EOF, pokreće i ionska pokretljivost prema katodi. Zatim slijede neutralne čestice, koje se kreću brzinom EOF, a posljednji putuju anioni.



Slika 4. EOF i redoslijed kretanja molekula kroz kapilaru u kapilarnoj elektroforezi (Lauer i Rozing, 2009 i Nigović, 2014b)

Elektroosmotski tok, osim svojih prednosti, ima i određene nedostatke. Tijekom uzastopnih analiza, on se može promijeniti uslijed adsorpcije ispitivanih tvari na stijenku kapilare. Kako bi se osigurala reproducibilnost metode i spriječilo začepljivanje te eventualno pucanje kapilare, nužno je optimizirati i ispiranja kapilare između mjerenja tijekom razvoja nove kapilarnoelektroforetske metode (Sertić, 2016).

Razvijeno je više vrsta kapilarne elektroforeze koje se razlikuju prema mehanizmu razdvajanja različitih analita (Sertić, 2013).

1.3.1. Micelarna elektrokinetička kromatografija

Micelarna elektrokinetička kromatografija (engl. *Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography*, MEKC) je široko rasprostranjeni i korišteni oblik kapilarne elektroforeze. To je metoda koja uspješno kombinira elektroforezu i kromatografiju. Za razliku od kapilarne zonske elektroforeze, micelarnom elektrokinetičkom kromatografijom moguće je analizirati i neutralne analite, uz dodatak surfaktanta u otopinu radnog pufera. Surfaktanti su amfifilne tvari, što znači da posjeduju hidrofilni i hidrofobni dio. Iznad određene koncentracije, nazvane kritična micelarna koncentracija (engl. *Critical Micellar Concentration*, CMC), surfaktanti

agregiraju i stvaraju micele, sferične tvorbe koje ulaze u hidrofobne i/ili elektrostatske interakcije s analitima. Zbog ovih interakcija i naboja na micelama, neutralni analiti putuju kroz kapilaru brzinom ovisnom o raspodjeli između micele i otopine elektrolita. Što su analiti hidrofobniji, ulaze u jače interakcije s micelom, te se duže zadržavaju u kapilari (Sertić, 2013; Watson, 1999).

Najčešće korišteni surfaktant u micelarnoj elektrokinetičkoj kromatografiji je natrijev dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulphate*, SDS), anionski surfaktant koji stvara micele iznad koncentracije 8-9 mM i temperature od 16 °C.

Brojni su parametri koji se mogu modificirati kako bi se postigli optimalni uvjeti za provođenje analize. Osim već spomenutih modifikacija duljine kapilare te primijenjenog napona, moguće je i mijenjanje sastava radnog pufera dodatkom raznih aditiva (organska otapala, ciklodekstrini itd) kako bi se poboljšalo razdvajanje analita (Hancu i sur, 2013).

Zbog svih navedenih prednosti, micelarna elektrokinetička kromatografija vrlo je važna tehnika u analitici lijekova.

2. OBRAZLOŽENJE RADA

Febuksostat, kao relativno nov lijek, još uvijek nema službenu farmakopejsku monografiju, stoga je cilj ovog diplomskog rada započeti razvoj kapilarnoelektroforetske metode za analizu utjecaja kiseline na febuksostat ekstrahiran iz tablete, u sklopu stres studija nužnih za razvoj stabilitetno indikativne metode.

Kao najprikladnija tehnika za ovaj rad odabrana je micelarna elektrokinetička kromatografija (MEKC), obzirom na strukturu febuksostata i njegovih onečišćenja.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

Acetonitril, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck)

Dimetilsulfoksid (Merck)

Klorovodična kiselina (Lac-ner)

Metanol (J.T.Baker)

Natrij dodecil sulfat (Sigma-Aldrich)

Natrij tetraborat (Kemika)

1 M NaOH (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

Standardi:

- Febuksostat (TLC Pharmaceutical StandardsLtd, Ontario Canada)
- Febuksostat DEE (2-[3-(etoksikarbonil)-4-izobutoksifenil]-4-metiltiazol-5-karboksilna kiselina) (TLC Pharmaceutical StandardsLtd, Ontario Canada)
- Febuksostat amid (2-[3-karbamoil-4-izobutoksifenil]-4-metiltiamazol-5-karboksilna kiselina) (TLC Pharmaceutical StandardsLtd, Ontario Canada)
- Etil febuksostat (etil 2-[3-cijano-4-izobutoksifenil]-4-metiltiazol-5-karboksilat) (TLC Pharmaceutical StandardsLtd, Ontario Canada)
- Pravastatin (Pliva)
- Ketoprofen (Sigma-Aldrich)

Ultračista voda (Labconco, Kansas City, MI, SAD)

Adenuric® 80 mg tablete (Berlin-Chemie Menarini Hrvatska)

3.1.2. Radni instrumenti

Analitička vaga, model AG245 (Mettler Toledo)

Centrifuga (Nanofuge, Hoefer Scietific Instruments)

Uređaj za kapilarnu elektroforezu, G1600A (Agilent Technologies)

Ultrazvučna kupelj (Elma)

Tresilica (IKA)

3.1.3. Pribor

Bočice za uzorkovanje, 1,5 mL (Agilent Technologies)

Injekcijski filtri Acrodisc GHP, veličina pora 0,20 μm, promjer 26 mm (Gelman)

Kapilara od izvučenog kvarca 32 / 35 cm, unutarnji promjer 50 μm (Agilent Technologies)

3.1.4. Programski paketi

3D-CE/MSD ChemStation, Rev. A. 10.02 (1757) (Agilent Technologies)

Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft)

3.2. METODE

3.2.1. Priprema standardnih otopina

Standardne otopine febuksostata, febuksostata DEE i etil febuksostata pripremljene su otapanjem odgovarajuće količine čistih supstancija u acetonitrilu kako bi se postigla koncentracija 500 μg/mL. Standardna otopina febuksostat amida pripremljena je otapanjem odgovarajuće količine supstancije u dimetilsulfoksidu kako bi se postigla koncentracija 500 μg/mL.

Pravastatin, korišten kao unutarnji standard, otopljen je u ultračistoj vodi, a koncentracija mu je također iznosila 500 μg/mL.

Drugi korišteni unutarnji standard, ketoprofen, otopljen je u metanolu te je i njegova koncentracija iznosila 500 μg/mL.

Sve su otopine bile izložene ultrazvučnoj kupelji na 5 minuta, kako bi se povećala topljivost krutih supstancija. Osim febuksostat amida, koji se skladišti na sobnoj temperaturi, sve su standardne otopine bile čuvane u hladnjaku na 4°C.

3.2.2. Ekstrakcija febuksostata iz komercijalno dostupne tablete

10 tableta Adenuric® najprije je izvagano na analitičkoj vagi, a zatim propisno usitnjeno u tarioniku do sitnog praha. Odgovarajuća količina usitnjenih tableta prenesena je u odmjernu tikvicu od 5 mL u koju je dodan acetonitril. Ekstrakcija je vršena na ultrazvučnoj kupelji tijekom 20 minuta. Alikvoti otopine su prenešeni u eppendorf epruvete od 1,5 mL te centrifugirane 5 minuta na 6400 rpm. Supernatant je profilitriran mikrofilterima za šprice veličine pora 0,2 μm i pohranjen u hladnjaku na 4-8 °C. Prije analize otopine su razrijeđene acetonitrilom do odgovarajuće koncentracije.

3.2.3. Priprema radnog pufera

Otopina boratnog pufera koncentracije 100 mM pripremljena je otapanjem odgovarajuće količine natrijevog tetraborata u ultračistoj vodi. Otopina surfaktanta SDS-a koncentracije 100 mM pripremljena je otapanjem odgovarajuće količine natrijevog dodecil sulfata u ultračistoj vodi. Radni pufer pripremao se svakodnevno, miješanjem odgovarajućeg volumena boratnog pufera, otopine SDS-a i ultračiste vode, uz eventualni dodatak organskog

otapala acetonitrila ili metanola u željenim omjerima. Prije miješanja otopine su filtrirane kroz mikrofilter.

3.2.4. Priprema instrumenta

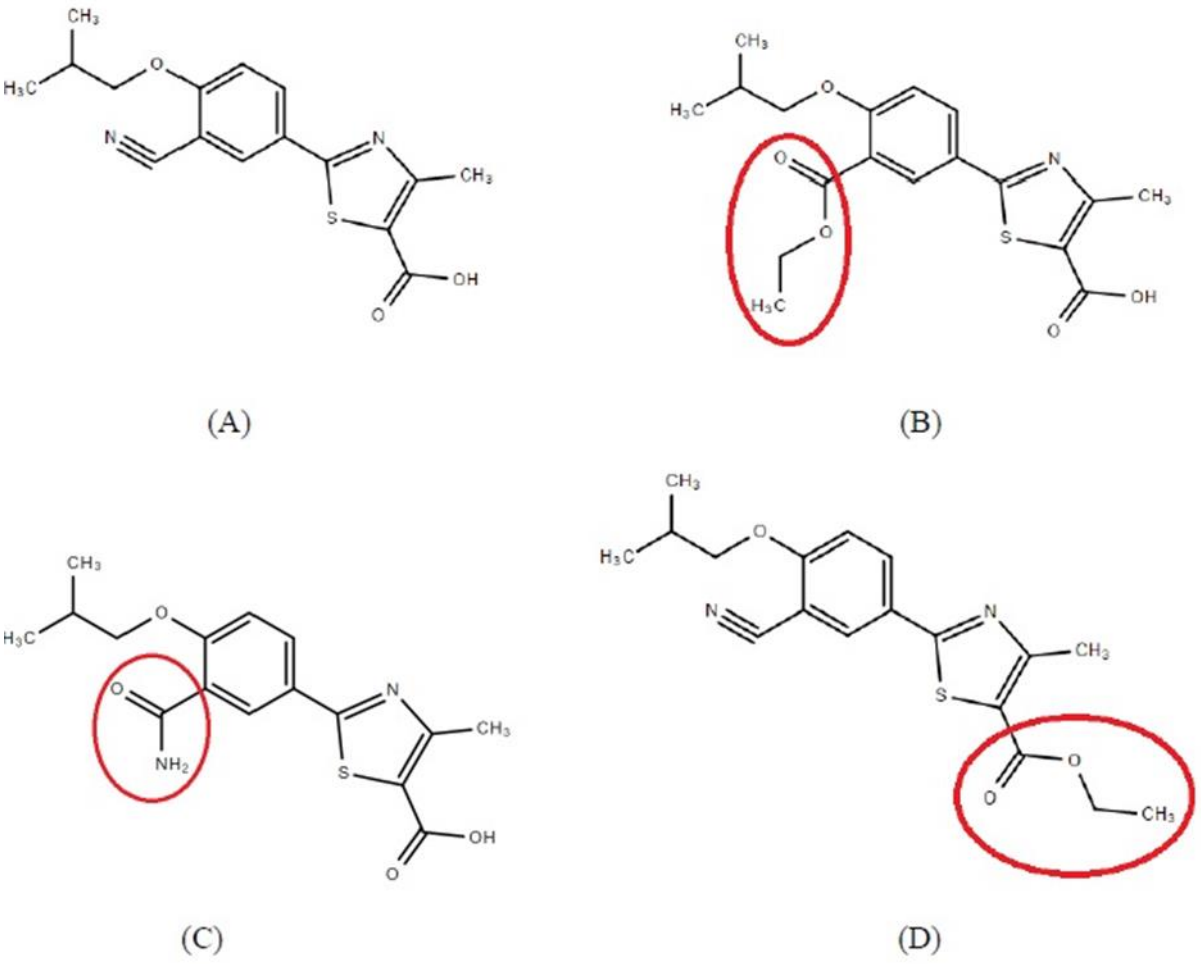
Prije prvog korištenja instrumenta nužno je kondicionirati kapilaru ispiranjem s 1 M NaOH 20 minuta, potom s 0,1 M NaOH 20 minuta, 10 minuta ultračistom vodom te na kraju 10 minuta otopinom radnog pufera. Na početku svakog radnog dana, kapilara se kondicionira ispiranjem 10 minuta s 0,1 M NaOH, 10 minuta ultračistom vodom te 10 minuta otopinom radnog pufera. Kako bi se osigurala ponovljivost rezultata, kapilara se 3 minute ispirala otopinom radnog pufera između svake analize. Na kraju svakog radnog dana, kapilara se 10 minuta ispire s ultračistom vodom, nakon čega se elektrode uranjaju u bočice za uzorkovanje ispunjene ultračistom vodom.

3.2.5. Analiza uzorka

Analiza se provodi na uređaju za kapilarnu elektroforezu koristeći kapilaru od izvučenog kvarca unutarnjeg promjera 50 μm. Uzorci se injektiraju u kapilaru pod tlakom od 50 mbar, pri temperaturi od 25 °C tijekom 6 sekundi. Analiza se provodi pri valnoj duljini detektora od 237 nm i pri naponu od 30 kV.

4. REZULTATI I RASPRAVA

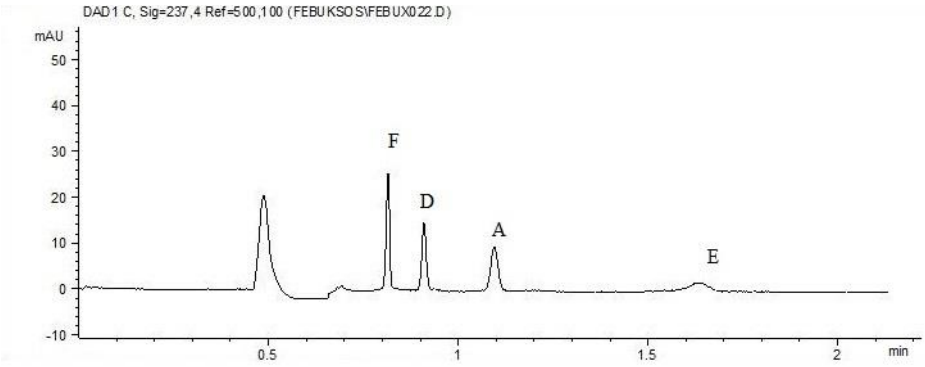
Micelarna elektrokinetička kromatografija (MEKC) odabrana je kao najprikladnija metoda za istovremenu analizu febuksostata i njegovih onečišćenja budući da dodatkom surfaktanta u otopinu radnog pufera pri koncentraciji većoj od kritične micelarne koncentracije (CMC) nastaju micele, nabijene sferične tvorbe, koje omogućuju detekciju ne samo nabijenih, već i neutralnih spojeva, u ovom slučaju onečišćenja etil febuksostata (Slika 5). Ispitan je utjecaj različitih koncentracija klorovodične kiseline na površinu pika febuksostata u različitim vremenima, odnosno na razgradnju samog lijeka, što je detaljnije opisano u poglavlju 4.4. Cilj metode je svakako osigurati razdvajanje između svih novonastalih razgradnih produkata, pa je optimizacija metode proces koji prati samu razgradnu studiju.



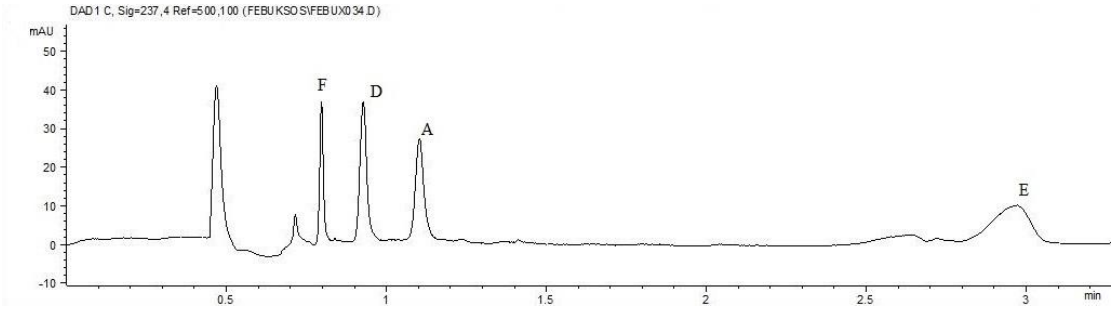
Slika 5. Kemijska struktura febuksostata (A), febuksostat DEE-a (B), febuksostat amida (C), etil febuksostata (D).

4.1. ODABIR RADNOG PUFERA

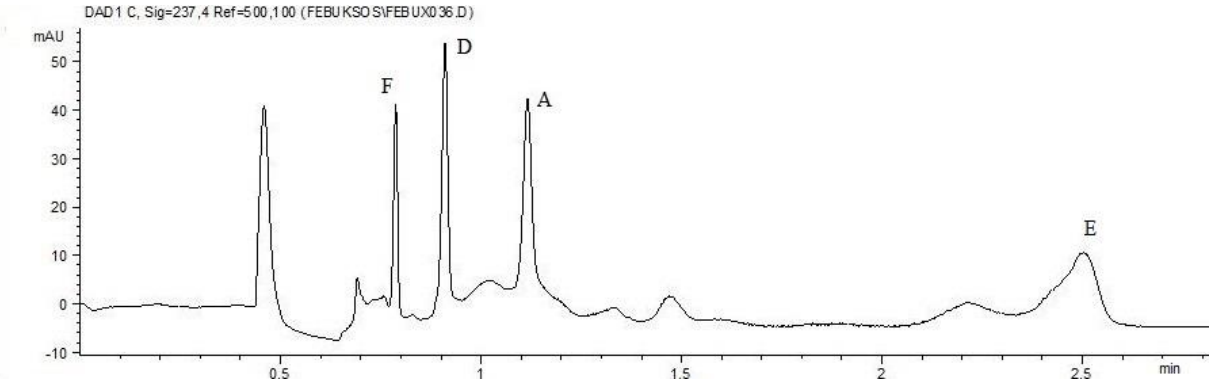
Ispitan je utjecaj različitih radnih pufera na položaj i širinu pikova (Slike 6, 7 i 8). Redoslijed eluiranja analita ovisan je o njihovoj lipofilnosti, naboju te veličini. Pozitivno nabijene molekule kreću se najbrže, jer ih pokreće ionska pokretljivost prema katodi i elektroosmotski tok. Budući da je elektroforetska pokretljivost obrnuto proporcionalna polumjeru čestice, mali kationi putovati će brže od velikih. Micele dodanog surfaktanta negativnog su naboja, pa se kreću sporije od elektroosmotskog toka, a što su analiti lipofilniji, više ulaze u interakcije s micelama te se duže zadržavaju u kapilari (Sertić, 2016). Prvi je eluirao febuksostat, zatim febuksostat DEE, febuksostat amid i etil febuksostat kao posljednji. Odabrana je valna duljina detektora od 237 nm jer je pri njoj apsorbancija febuksostata visoka.



Slika 6. Elektroferogram smjese standardnih otopina febuksostata (F), febuksostat DEE-a (D), febuksostat amida (A) i etil febuksostata (E).
Uvjeti analize: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 50 mM SDS, napon 30 kV, 25°C, detekcija pri 237 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s. Ukupna duljina kapilare 32 cm.



Slika 7. Elektroferogram smjese standardnih otopina febuksostata (F), febuksostat DEE-a (D), febuksostat amida (A) i etil febuksostata (E).
Uvjeti analize: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 50 mM SDS, 10% acetonitril, napon 30 kV, 25°C, detekcija pri 237 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s. Ukupna duljina kapilare 32 cm.

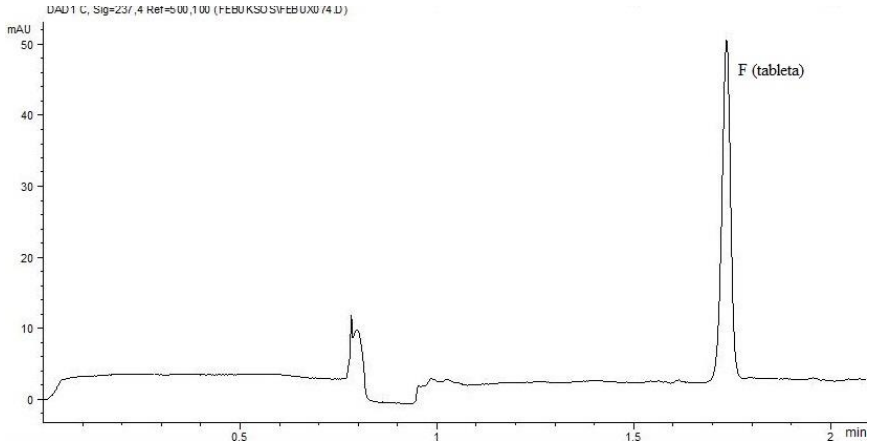


Slika 8. Elektroferogram smjese standardnih otopina febuksostata (F), febuksostat DEE-a (D), febuksostat amida (A) i etil febuksostata (E).
Uvjeti analize: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 50 mM SDS, 10% metanol, napon 30 kV, 25 °C, detekcija pri 237 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s. Ukupna duljina kapilare 32 cm.

Kao optimalan radni pufer odabrana je otopina sastava 20 mM boratnog pufera pH 9,3 te 50 mM SDS bez dodatka organskog otapala budući da dodatak organskog otapala nije poboljšao oblik pika onečišćenja etil febuksostata, a čak se i očekivano produljilo vrijeme analize zbog utjecaja dodatka organskog otapala na viskoznost radnog pufera i zeta potencijal na unutrašnjoj stijenci kapilare.

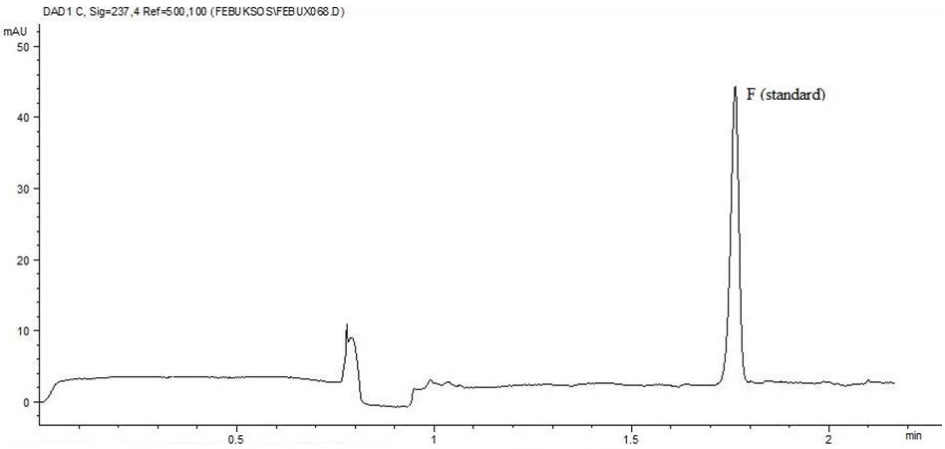
4.2. EKSTRAKCIJA FEBUKSOSTATA IZ TABLETE

Tablete febuksostata pripremljene su za analizu prema propisu opisanom u poglavlju 3.2.2. Na Slici 9 prikazan je elektroferogram uzorka otopine tablete febuksostata (0,5 mg/mL) u acetonitrilu. Otopina tablete ekstrahirana acetonitrilom razrijeđena je do radne koncentracije dodatkom ultračiste vode.



Slika 9. Elektroferogram otopine tablete febuksostata (F (tableta), 50 µg/mL).
Uvjeti analize: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 50 mM SDS, napon 30 kV, 25 °C, detekcija pri 237 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s. Ukupna duljina kapilare 35 cm.

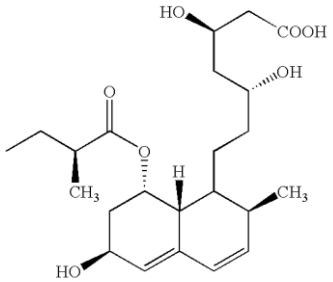
Pri istim uvjetima analize snimljen je i standard febuksostata u istoj koncentraciji kao i otopina tablete (Slika 10). Usporedbom s elektroferogramom otopine tablete febuksostata vidljivo je da se pik febuksostata javlja u istom vremenu kao i pik febuksostata iz standardne otopine.



Slika 10. Elektroferogram standardne otopine febuksostata (F (standard), 50 µg/mL).
Uvjeti analize: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 50 mM SDS, napon 30 kV, 25°C, detekcija pri 237 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s. Ukupna duljina kapilare 35 cm.

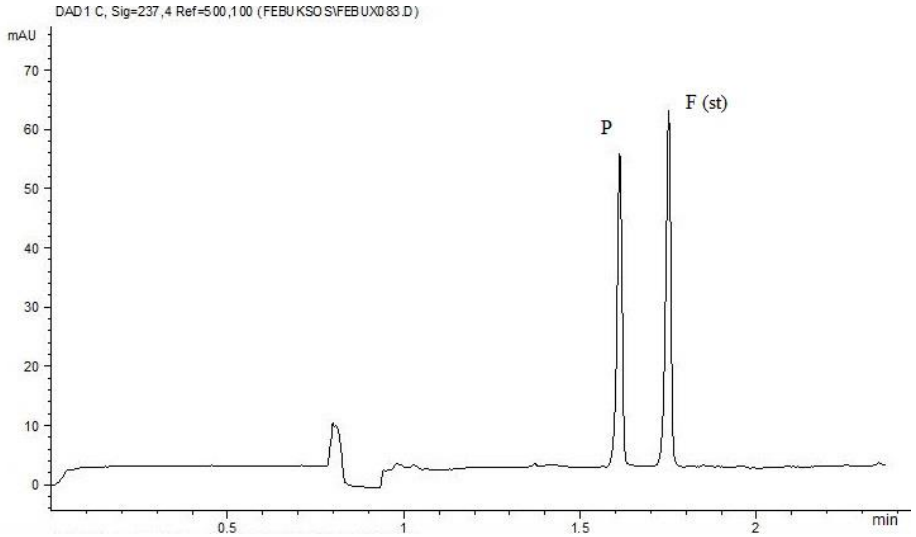
4.3. ODABIR UNUTARNJEG STANDARDA

Za osiguravanje vjerodostojnosti rezultata, u uzorak se dodaje pravastatin kao unutarnji standard. Unutarnji standard je tvar koja služi za otklanjanje potencijalnih pogrešaka koje mogu nastati zbog vrlo malih volumena injektiranih u kapilaru, kao i zbog razlika u elektroosmotskom toku te varijacija napona. To je obično tvar fizikalno kemijskih svojstava sličnih analitu kojeg analiziramo. Pravastatin (Slika 11) kao δ-hidroksi kiselina s pKa vrijednosti 4,2 je pri pH 9 radnog pufera u potpunosti ioniziran i negativno nabijen, kao i febuksostat. Osim toga pravastatin je relativno hidrofilan spoj, zahvaljujući svojim polarnim hidroksilnim skupinama koje su vezane na dekalinski prsten (Sertić, 2013; Nigović i Vegar, 2008).



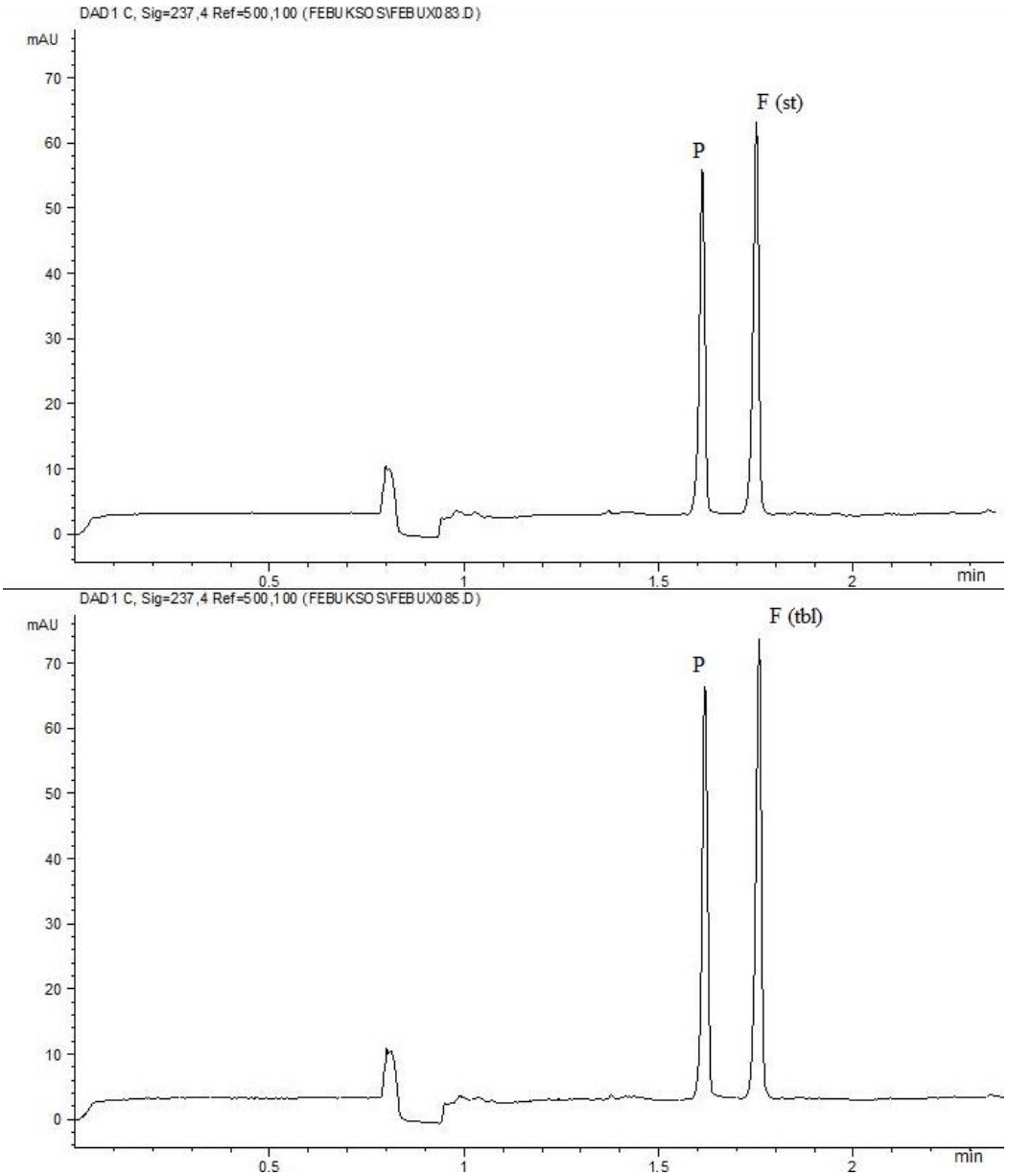
Slika 11. Kemijska struktura pravastatina

Pravastatin je otopljen u ultračistoj vodi i njegova koncentracija iznosi 0,5 mg/mL. Pravastatin eluira prije febuksostata (Slika 12).



Slika 12. Elektroferogram standardne otopine febuksostata (F (st), 50 μg/mL) i pravastatina (P, 50 μg/mL).
Uvjeti analize: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 50 mM SDS, napon 30 kV, 25 °C, detekcija pri 237 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s. Ukupna duljina kapilare 35 cm.

Također, snimljen je i elektroferogram otopine tablete febuksostata uz dodatak pravastatina, čime je potvrđen identitet pika febuksostata snimljen na elektroferogramu same otopine tablete febuksostata. Usporedba elektroferograma otopine standarda febuksostata i pravastatina te elektroferograma otopine tablete febuksostata i pravastatina prikazana je na Slici 13.



Slika 13. Usporedba elektroferograma standardne otopine febuksostata (F (st), 50 µg/mL) i pravastatina (P, 50 µg/mL) (na slici gore) s elektroferogramom otopine tablete febuksostata (F (tbl) 50 µg/mL) i pravastatina (P, 50 µg/mL) (na slici dolje).
Uvjeti analize: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 50 mM SDS, napon 30 kV, 25 °C, detekcija pri 237 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s. Ukupna duljina kapilare 35 cm.

Uspješnost ekstrakcije febuksostata iz tablete iskazuje se kao analitički prinos (engl. *recovery*), odnosno omjer srednje vrijednosti omjera pika febuksostata iz standardne otopine i pika pravastatina te omjera pika febuksostata ekstrahiranog iz tablete i pika pravastatina, izražen u postotku (Tablica 3).

	Broj mjerenja	Površina pika febuksostata (F)	Površina pika pravastatina (P)	Omjer površine pikova F i P	Srednja vrijednost omjera površine pikova F i P	SD	RSD (%)
FEBUKSOSTAT IZ STANDARDNE OTOPINE	1	46,6883	42,1754	1,107	1,108	0,0025	0,2239
	2	45,8808	41,4524	1,107			
	3	43,9599	39,5603	1,111			
FEBUKSOSTAT EKSTRAHIRAN IZ TABLETE	1	46,2907	42,8735	1,08	1,086	0,0058	0,5346
	2	47,5954	43,7149	1,089			
	3	47,2559	43,3331	1,091			
ANALITIČKI PRINOS (RECOVERY)							**98,01%**

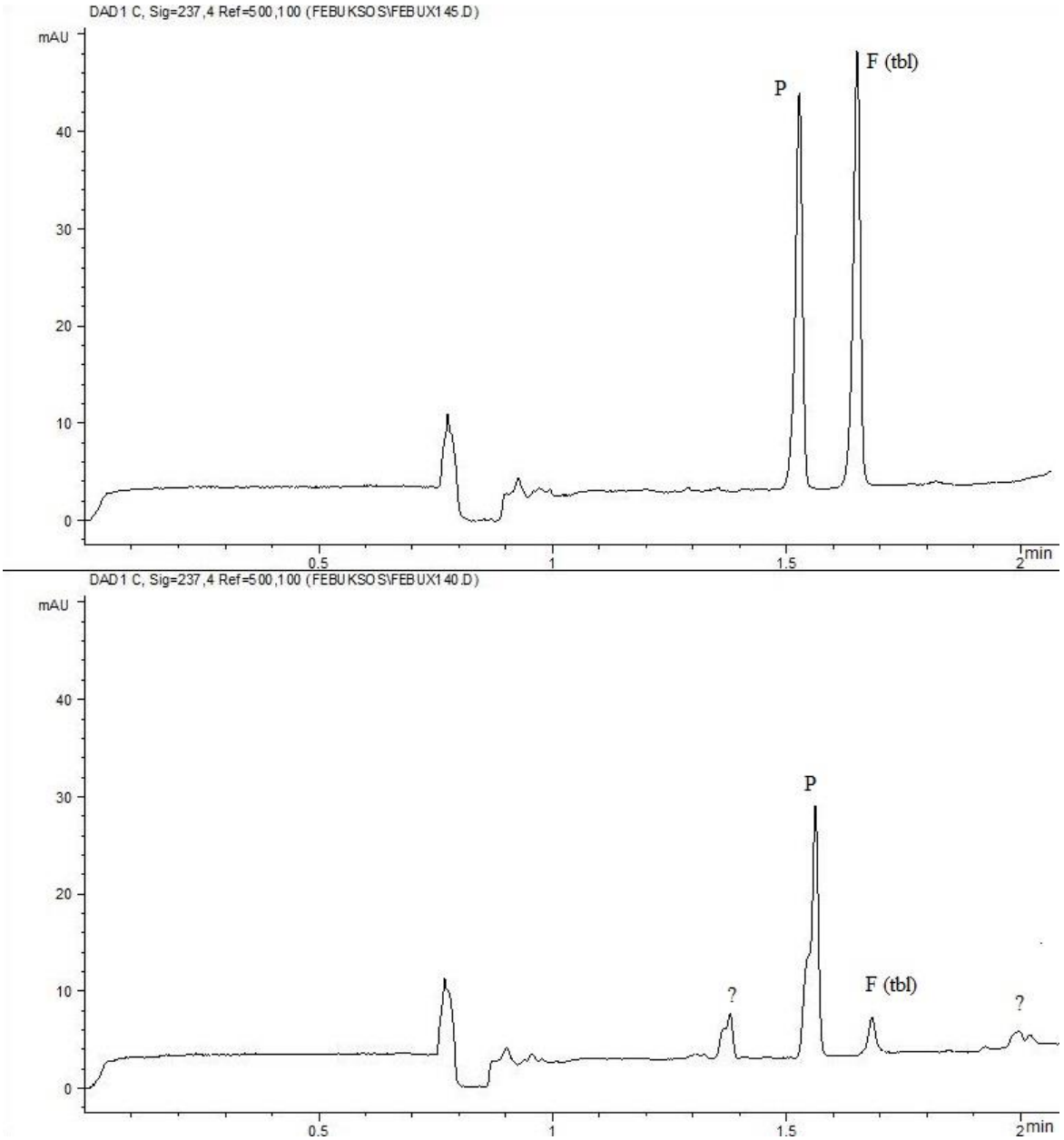
Tablica 3. Izračun uspješnosti ekstrakcije (analitički prinos, recovery) febuksostata iz tablete uz pravastatin kao unutarnji standard

Nakon uspješne ekstrakcije febuksostata iz tablete (analitički prinos od 98,01%), sljedeći korak jest podvrgnuti otopinu febuksostata iz tablete djelovanju kiseline. Nakon proučavanja literature vezane za ispitivanje utjecaja kiseline na febuksostat (Tablica 2. iz poglavlja 1.2.3.1.), obzirom na korištenu metodu i uvjete ispitivanja, odlučeno je započeti ispitivanje s 1 M klorovodičnom kiselinom (Dalmora i sur, 2014).

Dodatkom 1 M HCl, nakon jednog sata uočeno je smanjenje površine pika febuksostata, ali i pojava novih pikova te smanjenje površine pika pravastatina (Slika 14). Iako je, kao unutarnji standard, pravastatin dodan neposredno prije analize, krenula je njegova razgradnja, zbog čega se nameće potreba za odabirom novog unutarnjeg standarda.

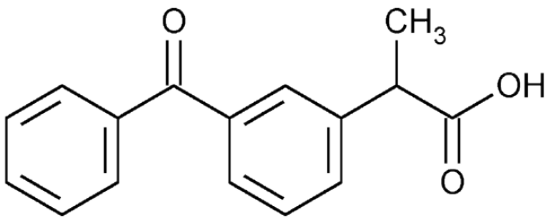
Objašnjenje ovakve degradacije pravastatina nalazi se u činjenici da on pri niskom pH laktonizira i epimerizira. Pik koji eluira prije pravastatina mogao bi se odnositi na C-6 epimer pravastatina koji je također negativnog naboja, a u skladu s literaturom ima drugačiji koeficijent raspodjele između SDS micela i otopine radnog pufera nego pravastatin. Kako laktonski oblici pravastatina i njegovog C-6 epimera nemaju ionizirajućih funkcionalnih skupina, novonastali pikovi koji su eluirali nakon pravastatina mogu se odnositi upravo na neutralni lakton pravastatina te lakton njegovog C-6 epimera, zbog najvećeg afiniteta neutralnih molekula prema micelama (Nigović i Vegar, 2008).

Naravno, bez spregnutog sustava s masenim spektrometrom koji bi omogućio strukturnu karakterizaciju dobivenih razgradnih produkata pravastatina i febuksostata, moguće je jedino prema vremenu migracije identificirati tri onečišćenja febuksostata za koje imamo analitičke standarde.



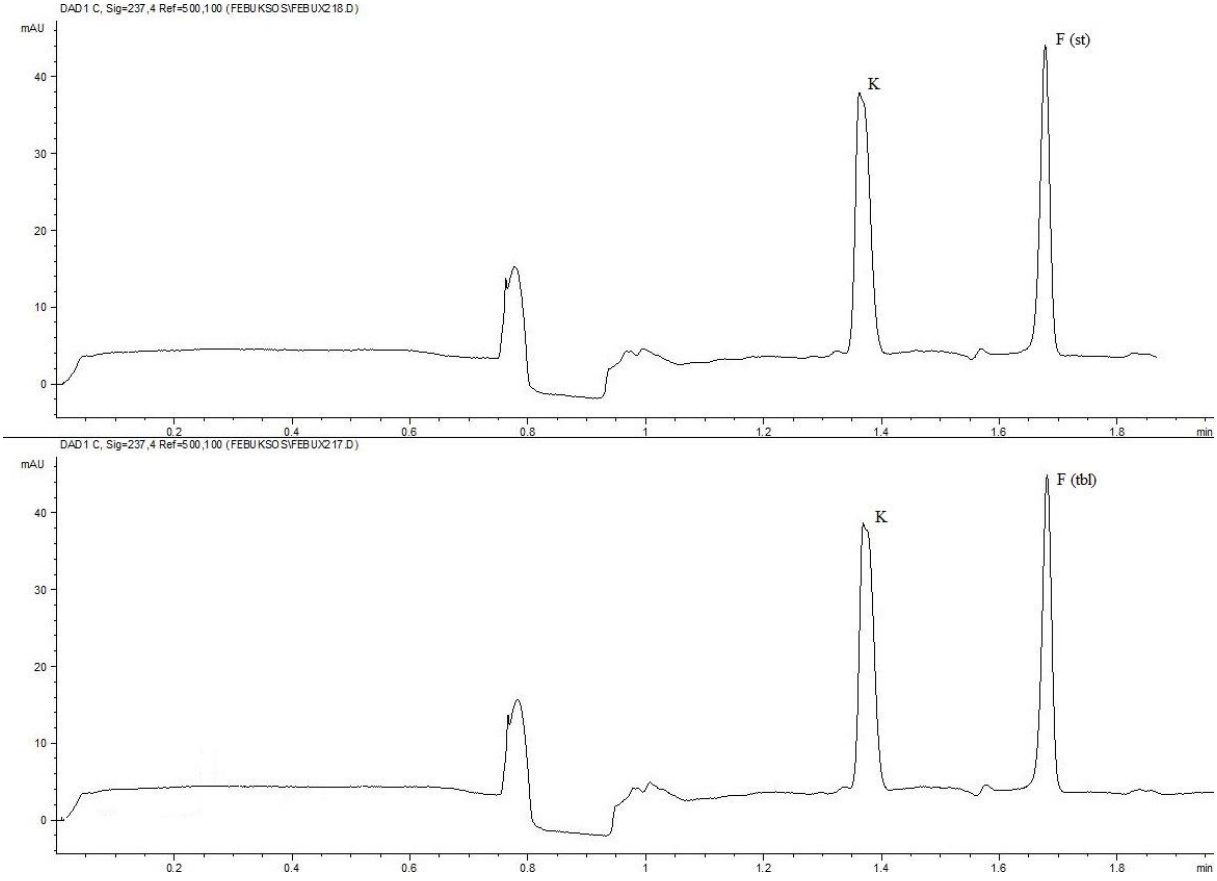
Slika 14. Usporedba elektroferograma tablete febuksostata (F (tbl), 50 µg/mL) i pravastatina (P, 50 µg/mL) (na slici gore) s elektroferogramom otopine tablete febuksostata (F (tbl), 50 µg/mL) i pravastatina (P, 50 µg/mL) 1 h nakon dodatka 1 M HCl (na slici dolje).
Uvjeti analize: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 50 mM SDS, napon 30 kV, 25 °C, detekcija pri 237 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s. Ukupna duljina kapilare 35 cm.

Kao novi unutarnji standard, umjesto pravastatina, odabran je ketoprofen (Slika 15), koji također kao i febuksostat te pravastatin, posjeduje karboksilnu skupinu te je negativno nabijen u lužnatom mediju.



Slika 15. Kemijska struktura ketoprofena

Tijekom slijedeće analize, u uzorak je dodano 50 µL ketoprofena (0,5 mg/mL) otopljenog u metanolu (Slika 16).



Slika 16. Usporedba elektroferograma standardne otopine febuksostata (F (st), 50 µg/mL) i ketoprofena (K, 50 µg/mL) (na slici gore) s elektroferogramom otopine tablete febuksostata (F (tbl), 50 µg/mL) i ketoprofena (K, 50 µg/mL) (na slici dolje).

Uvjeti analize: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 50 mM SDS, napon 30 kV, 25 °C, detekcija pri 237 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s. Ukupna duljina kapilare 35 cm.

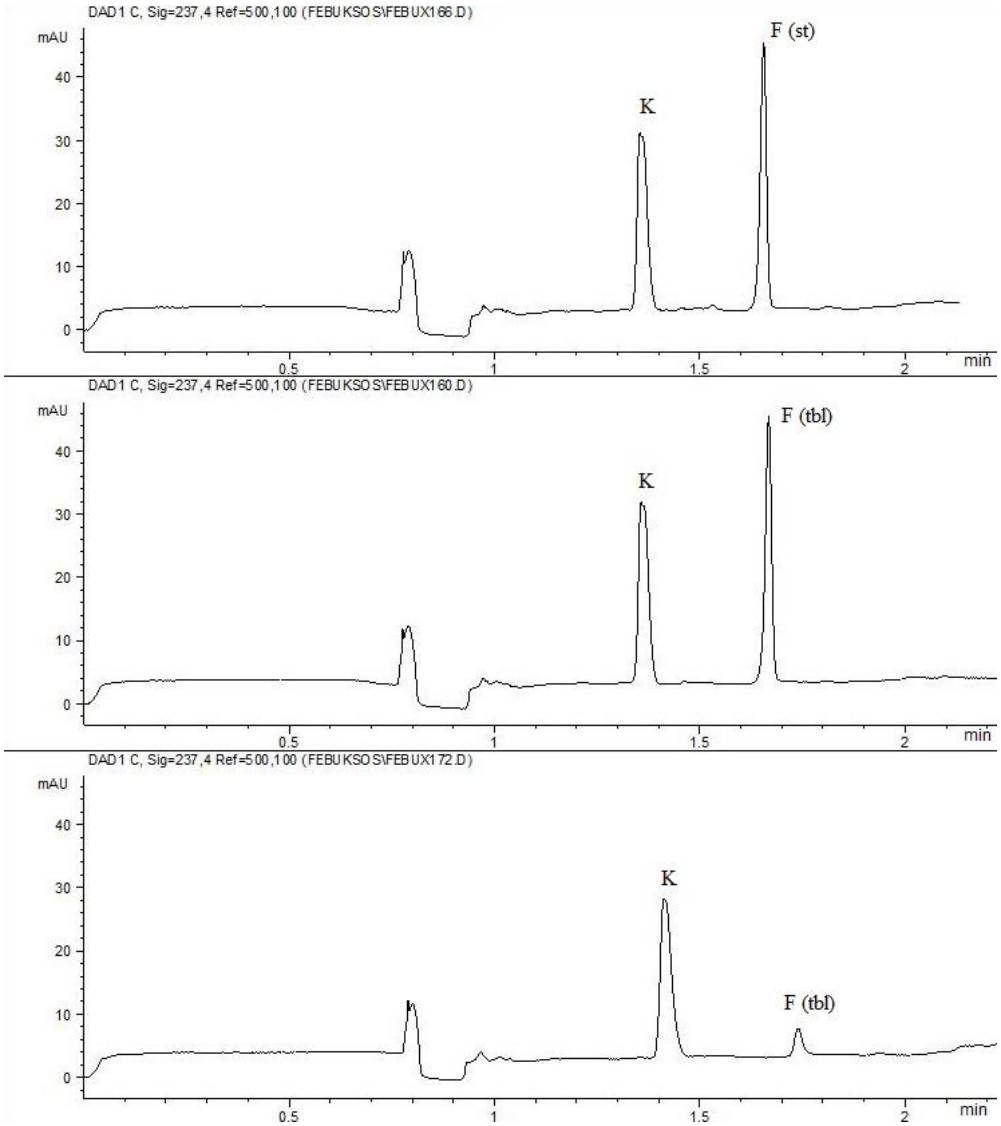
Ponovno je utvrđen analitički prinos, ovoga puta u iznosu od 98,29% (Tablica 4).

	Broj mjerenja	Površina pika febuksostata (F)	Površina pika ketoprofena (K)	Omjer površine pikova F i K	Srednja vrijednost omjera površine pikova F i K	SD	RSD (%)
FEBUKSOSTAT IZ STAND. OTOPINE	1	43,336	53,4665	0,8105	0,8149	0,0062	0,7643
	2	46,7372	57,0429	0,8193			
FEBUKSOSTAT EKSTRAHIRAN IZ TABLETE	1	46,5745	57,9438	0,8038	0,801	0,004	0,4942
	2	45,2445	56,684	0,7982			
ANALITIČKI PRINOS (RECOVERY)							**98,29%**

Tablica 4. Izračun uspješnosti ekstrakcije (analitički prinos, recovery) febuksostata iz tablete uz ketoprofen kao unutarnji standard

4.4. UTJECAJ RAZLIČITIH KONCENTRACIJA KLOROVODIČNE KISELINE NA RAZGRADNJU FEBUKSOSTATA

Otopina tablete febuksostata podvrgnuta je djelovanju 1 M HCl tijekom 1 h, nakon čega je snimljen elektroferogram koji je potom uspoređen s elektroferogramima standardne otopine febuksostata te otopine febuksostata iz tablete prije degradacije kiselinom (Slika 17). Neposredno prije svake analize dodan je ketoprofen kao unutarnji standard.

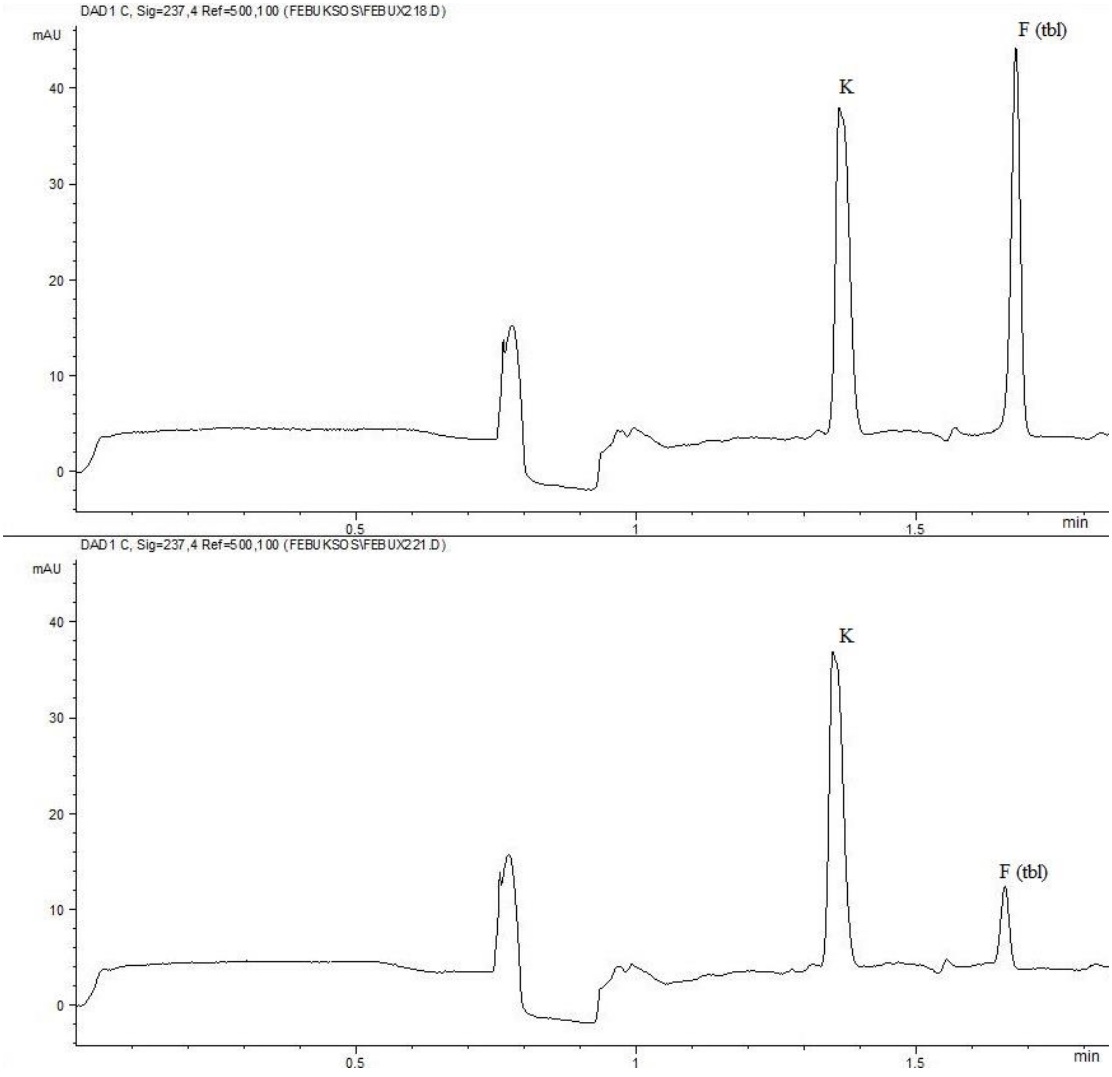


Slika 17. Usporedba elektroferograma standardne otopine febuksostata (F (st)) i ketoprofena (K) (na slici gore) s elektroferogramom otopine tablete febuksostata (F (tbl)) i ketoprofena (K) (na slici u sredini) te elektroferogramom otopine tablete febuksostata i ketoprofena (K, 50 µg/mL) 1h nakon dodatka 1 M HCl (na slici dolje).
Uvjeti analize: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 50 mM SDS, napon 30 kV, 25 °C, detekcija pri 237 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s. Ukupna duljina kapilare 35 cm.

Iz Slike 17 vidljivo je da se površina pika ketoprofena nije bitno mijenjala, niti su nastali novi pikovi, što ukazuje na to da je ketoprofen bolji izbor za unutarnji standard od pravastatina.

Usporedbom omjera površina pikova febuksostata i ketoprofena prije i poslije dodatka kiseline, utvrđeno je kako je ovakva koncentracija kiseline previsoka te se daljnji razvoj metode nastavlja s dodatkom 0,1 M HCl.

Snimljen je elektroferogram tablete febuksostata i ketoprofena kao unutarnjeg standarda s dodatkom 0,1 M HCl nakon 2 h i 50 min (Slika 18).



Slika 18. Usporedba elektroferograma tablete febuksostata (F (tbl), 50 µg/mL) i ketoprofena (K, 50 µg/mL) (na slici gore) s elektroferogramom otopine tablete febuksostata (F (tbl), 50 µg/mL) i ketoprofena (K, 50 µg/mL), 2 h i 50 min nakon dodatka 0,1 M HCl (na slici dolje). Uvjeti analize: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 50 mM SDS, napon 30 kV, 25 °C, detekcija pri 237 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s. Ukupna duljina kapilare 35 cm.

Nakon analize u ovakvim uvjetima, iz usporedbe omjera površina pikova febuksostata i ketoprofena prije i poslije degradacije vidljivo je da je nakon 2 h i 50 min postignuta puno veća degradacija (80,72%) od one nužne za razvoj stabilitetno indikativne metode (a koja iznosi 5-20%) (Tablica 5).

	Površina pika febuksostata	**Površina pika ketoprofena**	**Omjer površine pikova F i K**
Febuksostat (iz tablete)	46,5745	57,9438	0,804
Febuksostat (iz tablete) + 0,1 M HCl nakon 2 h i 50 min	8,6315	55,6079	0,155
Postignuta degradacija			**80,7214%**

Tablica 5. Usporedba omjera površina pikova febuksostata i ketoprofena prije i poslije degradacije s 0,1 M HCl.

Obzirom na podatke iz Tablice 5, kao izazov preostaje ustvrditi prikladno vrijeme tijekom kojega će otopina tablete febuksostata biti izložena optimalnoj koncentraciji kiseline. Također, potrebno je odrediti koliki je volumen NaOH potreban za neutralizaciju i zaustavljanje degradacije kiselinom, kako bi se mogla utvrditi eventualna prisutnost nekih od prethodno spominjanih onečišćenja febuksostata.

5. ZAKLJUČCI

Tijekom razvoja kapilarnoelektroforetske metode za analizu utjecaja kiseline na febuksostat ekstrahiran iz tableta, kao optimalni radni pufer pokazala se otopina sastava 20 mM boratnog pufera pH 9,3 i 50 mM SDS bez dodatka organskog otapala.

Ekstrakcija febuksostata iz Adenuric® tableta pokazala se uspješna s oba istraživana unutarnja standarda pri čemu je analitički prinos s pravastatinom iznosio 98,01%, a s ketoprofenom 98,29%.

Dodatak klorovodične kiseline uzrokovao je epimerizaciju i laktonizaciju pravastatina, kao potencijalnog unutarnjeg standarda, što je za posljedicu imalo pojavu novih pikova. Suprotno, dodatak klorovodične kiseline nije uzrokovao bitne promjene u razgradnji ketoprofena, te se on pokazao kao bolji izbor za unutarnji standard.

Koncentracija klorovodične kiseline u iznosu 0,1 M pokazala se pogodnija za analizu, budući da je 1 M klorovodična kiselina uzrokovala pretjeranu razgradnju febuksostata.

U daljnjim istraživanjima nužno je odrediti optimalno vrijeme izloženosti kiselini, jer je vrijeme izloženosti 0,1 M klorovodičnoj kiselini u trajanju od 2 h i 50 min dovelo do prevelike razgradnje febuksostata (80,72%).

Određivanje optimalnog volumena te koncentracije natrijevog hidroksida potrebnog za zaustavljanje kisele hidrolize također treba biti predmetom budućih istraživanja.

6. POPIS LITERATURE

Bakshi M, Singh S. Development of Validated Stability-indicating Assay Methods (Critical Review). *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, 28, 1011–1040.

Blessy M, Patel RD, Prajapati PN, Agrawal YK. Development of Forced Degradation and Stability. Indicating Studies of Drugs - A Review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2014, 4 (3), 159–165.

Brummer H. How to approach a forced degradation study. *Life science Technical Bulletin*, 2011, 31, 1-5.

Charde MS, Kumar J, Welankiwar AS, Chakole RD. Review: Development of forced degradation studies of drugs. *International Journal of Advances in Pharmaceutics*, 2013, 2 (3), 34-39.

Cione AP, Tonhi E, Silva P. Stability Indicating Methods. U: Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas. Shoyama Y (Ed.), Shangai, InTech, 2011, str. 24-34.

Dalmora SL, Souto RB, Machado FT, Schramm VG, Pinto MA, Walter ME, Stamm FP. Validation of a stability-indicating micellar electrokinetic capillary method for the assessment of febuxostat and its correlation with the reversed-phase LC method. *Anal. Methods*, 2014, 6, 3811-3816.

Edwards NL. Febuxostat: a new treatment for hyperuricaemia in gout. *Rheumatology (Oxford)*, 2009, 48 (2), 15-19.

Garcia-Valladares I, Khan T, R. Espinoza L. Efficacy and safety of febuxostat in patients with hyperuricemia and gout. *Ther Adv Musculoskelet Dis.*, 2011, 3 (5), 245–253.

Hancu G, Simon B, Rusu A, Mircia E, Gyéresi Á. Principles of Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography Applied in Pharmaceutical Analysis. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2013, 3 (1), 1-8.

ICH. About ICH. Vision. http://www.ich.org/about/mission.html, pristupljeno 25.4.2017.

Jalžabetić M. Analitički i regulatorni aspekt ispitivanja stabilnosti tableta od razvoja do odobrenja za stavljanje lijeka u promet, Specijalistički rad. Zagreb, 2016.

Klick S, Muijselaar PG, Waterval J, Eichinger T. Toward a Generic Approach for Stress Testing of Drug Substances and Drug Products. *Pharm.Technol*., 2005, 29, 48-66.

Lauer HH, Rozing GP. High Performance Capillary Electrophoresis. A primer. Agilent Technologies, 2009.

Mandle SD, Burade KB. An improved stability-indicating HPLC method for Febuxostat in bulk and pharmaceutical dosage forms. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Research*, 2013, 4, 1-10.

Mukthinuthalapati MA, Bandaru SP, Bukkapatnam V, Mohapatro C. Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method for the determination of febuxostat (a xanthine oxidase inhibitor*). J Chromatogr Sci*., 2013, 51 (10), 931-938.

Nigović B, Sertić M. Onečišćenja u lijekovima. *Farm Glas*, 2012, 68, 77-88.

Nigović B, Vegar I. Capillary Electrophoresis Determination of Pravastatin and Separation of Its Degradation Products. *Croat Chem acta*, 2008, 81 (4), 615-622.

Nigović B. Kapilarna elektroforeza. U: Analitika lijekova, Zagreb, 2014.

Rajyalakshmi CH, Benjamin T, Rambabu C. Stress Degradation Studies and Validation Method for Quantification of Febuxostat by using RP-HPLC. *International Journal of ChemTech Research*, 2013, 5 (4), 1462-1468.

Sekhar Reddy, BRC. A stability indicating RP-HPLC method development of Febuxostat in tablet dosage form. *Caribbean Journal of Science and Technology*, 2013, 1, 228-237.

Sertić M. Određivanje onečišćenja u lijekovima kapilarnom elektroforezom, Specijalistički rad. Zagreb, 2016.

Sertić M. Nove kapilarno elektroforetske i kromatografske metode u analitici statina, Doktorska disertacija, Zagreb, 2013.

Shete S, Dhale C, Joshi S, Hole R. Force Degradation Study to Stability Indicating Method. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2014, 3 (8), 863-873.

Singh S, Bakshi M. Guidance on Conduct of Stress Tests to Determine Inherent Stability of Drugs. *Pharm. Tech. On-line*, 2000, 24, 1-14.

Stability Testing of New Drug Substances and products 2003, International Conference on Harmonisation, Q1A (R2)

Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and products 1996, International Conference on Harmonisation, Q1B

Watson D. Pharmaceutical analysis. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1999, str. 293 - 311.

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1. SAŽETAK

Febuksostat je selektivni inhibitor ksantin oksidaze, snažan lijek koji se koristi u terapiji gihta, a u Republici Hrvatskoj registriran je 2012. godine. Još uvijek nema službenu monografiju niti u jednoj Farmakopeji. U ovom diplomskom radu započet je razvoj kapilarnoelektroforetske metode za analizu utjecaja kiseline na febuksostat ekstrahiran iz ljekovitog oblika, tableta Adenuric®, u sklopu stres studija nužnih za razvoj stabilitetno indikativne metode.

Kao najprikladnija metoda za analizu odabrana je micelarna elektrokinetička kromatografija zbog mogućnosti da se uz dodatak surfaktanta natrijevog dodecil sulfata (SDS-a) razdvoje i nabijeni i neutralni spojevi. Ispitani su različiti radni puferi te se kao najprikladniji pokazao radni pufer sastava 20 mM boratnog pufera pH 9,3 i 50 mM SDS-a, bez dodatka organskog otapala. Kao prikladan unutarnji standard odabran je ketoprofen, budući da mu dodatak kiseline nije uzrokovao promjene u visini i površini pika, za razliku od pravastatina koji je uz dodatak kiseline laktonizirao i epimerizirao.

Koncentracija klorovodične kiseline u iznosu od 0,1 M pokazala se prikladnom za analizu, dok je koncentracija u iznosu od 1 M uzrokovala pretjeranu razgradnju febuksostata. Vrijeme izloženosti febuksostata klorovodičnoj kiselini koncentracije 0,1 M u trajanju od 2 sata i 50 minuta dovelo je do prevelike razgradnje febuksostata, stoga je potrebno odrediti prikladno vrijeme izloženosti kiselini, kao i volumen te koncentraciju natrijevog hidroksida potrebnog za zaustavljanje kisele hidrolize. To prelazi okvire ovog diplomskog rada te ostaje kao izazov u budućim istraživanjima.

7.2. SUMMARY

Febuxostat is a selective inhibitor of xanthin oxidase, a potent drug used in gout therapy, and is registered in the Republic of Croatia in 2012. Febuxostat still does not have an official monograph in any Pharmacopoeia. In this graduate thesis the development of a capillary electrophoretic method for the analysis of the effect of acid on febuxostat extracted from the Adenuric® tablet was started, within stress studies necessary for the development of the stability-indicating method.

Micellar electrokinetic chromatography was chosen as the most suitable method, due to the possibility that with the addition of a surfactant (sodium dodecile sulphate, SDS) both neutral and charged compounds can be differentiated. Several working buffers were tested and the one composed of 20 mM borate buffer pH 9.3 and 50 mM SDS without the addition of organic solvent was shown as the most appropriate one. Ketoprofen was chosen as a suitable internal standard, since the addition of acid did not cause changes in height and area of its peak, unlike pravastatin which, by addition of acid, lactonized and epimerized.

The concentration of hydrochloric acid in the amount of 0.1 M was found to be suitable for analysis, while the concentration in the amount of 1 M caused excessive degradation of febuxostat. The exposure time of hydrochloric acid to 0.1 M for 2 hours and 50 minutes resulted in excessive degradation of febuxostat, so it is necessary to determine the appropriate exposure time to the acid as well as the volume and concentration of sodium hydroxide necessary to stop acid hydrolysis. It goes beyond the frameworks of this graduate work and remains a challenge in future research.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

RAZVOJ STABILITETNO INDIKATIVNE KAPILARNOELEKTROFORETSKE METODE ZA ANALIZU FEBUKSOSTATA

Nera Engler

SAŽETAK

Febuksostat je selektivni inhibitor ksantin oksidaze, snažan lijek koji se koristi u terapiji gihta, a u Republici Hrvatskoj registriran je 2012. godine. Još uvijek nema službenu monografiju niti u jednoj Farmakopeji. U ovom diplomskom radu započet je razvoj kapilarnoelektroforetske metode za analizu utjecaja kiseline na febuksostat ekstrahiran iz ljekovitog oblika, tableta Adenuric®, u sklopu stres studija nužnih za razvoj stabilitetno indikativne metode. Kao najprikladnija metoda za analizu odabrana je micelarna elektrokinetička kromatografija zbog mogućnosti da se uz dodatak surfaktanta natrijevog dodecil sulfata (SDS-a) razdvoje i nabijeni i neutralni spojevi. Ispitani su različiti radni puferi te se kao najprikladniji pokazao radni pufer sastava 20 mM boratnog pufera pH 9,3 i 50 mM SDS-a, bez dodatka organskog otapala. Kao prikladan unutarnji standard odabran je ketoprofen, budući da mu dodatak kiseline nije uzrokovao promjene u visini i površini pika, za razliku od pravastatina koji je uz dodatak kiseline laktonizirao i epimerizirao. Koncentracija klorovodične kiseline u iznosu od 0,1 M pokazala se prikladnom za analizu, dok je koncentracija u iznosu od 1 M uzrokovala pretjeranu razgradnju febuksostata. Vrijeme izloženosti febuksostata klorovodičnoj kiselini koncentracije 0,1 M u trajanju od 2 sata i 50 minuta dovelo je do prevelike razgradnje febuksostata, stoga je potrebno odrediti prikladno vrijeme izloženosti kiselini, kao i volumen te koncentraciju natrijevog hidroksida potrebnog za zaustavljanje kisele hidrolize. To prelazi okvire ovog diplomskog rada te ostaje kao izazov u budućim istraživanjima.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 35 stranica, 18 grafičkih prikaza, 5 tablica i 27 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: micelarna elektrokinetička kromatografija, febuksostat, forsirana razgradnja

Mentor: **Dr. sc. Miranda Sertić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Miranda Sertić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Biljana Nigović, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Maja Ortner Hadžiabdić, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj 2017.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Analysis
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

DEVELOPMENT OF STABILITY-INDICATING CAPILLARY ELECTROPHORESIS METHOD FOR THE ANALYSIS OF FEBUXOSTAT

Nera Engler

SUMMARY

Febuxostat is a selective inhibitor of xanthin oxidase, a potent drug used in gout therapy, and is registered in the Republic of Croatia in 2012. Febuxostat still does not have an official monograph in any Pharmacopoeia. In this graduate thesis the development of a capillary electrophoretic method for the analysis of the effect of acid on febuxostat extracted from the Adenuric® tablet was started, within stress studies necessary for the development of the stability-indicating method. Micellar electrokinetic chromatography was chosen as the most suitable method, due to the possibility that with the addition of a surfactant (sodium dodecile sulphate, SDS) both neutral and charged compounds can be differentiated. Several working buffers were tested and the one composed of 20 mM borate buffer pH 9.3 and 50 mM SDS without the addition of organic solvent was shown as the most appropriate one. Ketoprofen was chosen as a suitable internal standard, since the addition of acid did not cause changes in height and area of its peak, unlike pravastatin which, by addition of acid, lactonized and epimerized. The concentration of hydrochloric acid in the amount of 0.1 M was found to be suitable for analysis, while the concentration in the amount of 1 M caused excessive degradation of febuxostat. The exposure time of hydrochloric acid to 0.1 M for 2 hours and 50 minutes resulted in excessive degradation of febuxostat, so it is necessary to determine the appropriate exposure time to the acid as well as the volume and concentration of sodium hydroxide necessary to stop acid hydrolysis. It goes beyond the frameworks of this graduate work and remains a challenge in future research.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 35 pages, 18 figures, 5 tables and 27 references. Original is in Croatian language.

Keywords: micellar electrokinetic chromatography, febuxostat, forced degradation

Mentor: **Miranda Sertić**, **Ph.D.** *AssistantProfessor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Miranda Sertić**, **Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Biljana Nigović, **Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Maja Ortner Hadžiabdić, **Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted June 2017:.