

# Validacija micelarno elektrokinetičke kromatografske metode za određivanje onečišćenja febuksostata u ljekovitom obliku

---

Horvat, Laura

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:541055>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Laura Horvat**

**Validacija micelarno elektrokinetičke  
kromatografske metode za određivanje  
onečišćenja febuksostata u ljekovitom obliku**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

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

Zahvaljujem mentorici, doc. dr. sc. Mirandi Sertić, na iskazanom povjerenju, stručnim savjetima i znanju koje je podijelila sa mnom tijekom izrade diplomskog rada. Također zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima koji su me podržavali tijekom studija.

## SADRŽAJ

<b>1.</b>	Uvod .....	1
1.1.	Validacija analitičke metode .....	1
1.2.	Parametri validacije .....	1
1.3.	Kapilarna elektroforeza .....	3
1.3.1.	Micelarna elektrokinetička kromatografija (MEKC) .....	6
1.4.	Febuksostat .....	7
<b>2.</b>	Obrazloženje teme .....	9
<b>3.</b>	Materijali i metode .....	10
3.1.	Materijali .....	10
3.1.1.	Kemikalije .....	10
3.1.2.	Standardi .....	10
3.1.3.	Radni instrumenti .....	10
3.1.4.	Pribor .....	10
3.1.5.	Programski paketi .....	11
3.2.	Metode .....	11
3.2.1.	Priprema radnog pufera .....	11
3.2.2.	Priprema standardnih otopina .....	11
3.2.3.	Priprema instrumenta .....	12
3.2.4.	Analiza uzorka .....	12
<b>4.</b>	Rezultati i rasprava .....	13
4.1.	Ispitivanje linearnosti metode .....	15
4.1.1.	Ispitivanje linearnosti metode za febuksostat amid .....	15
4.1.2.	Ispitivanje linearnosti metode za febuksostat DEE .....	16
4.1.3.	Ispitivanje linearnosti metode za etil febuksostat .....	17
4.1.4.	Ispitivanje linearnosti metode za febuksostat .....	18
4.2.	Ispitivanje ponovljivosti metode .....	19

4.2.1. Ispitivanje ponovljivosti za febuksostat amid .....	19
4.2.2. Ispitivanje ponovljivosti za febuksostat DEE.....	20
4.2.3. Ispitivanje ponovljivosti za etil febuksostat .....	21
4.2.4. Ispitivanje ponovljivosti za febuksostat .....	22
<b>5.</b> Zaključci.....	23
<b>6.</b> Literatura .....	24
<b>7.</b> Sažetak/Summary .....	25
7.1. Sažetak.....	25
7.2. Summary .....	26
<b>8.</b> Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card	

## 1. Uvod

### 1.1. Validacija analitičke metode

Validacija analitičke metode je proces kojim se određuje i dokumentira prikladnost analitičke metode za određenu primjenu. Ona osigurava da će se u propisanim uvjetima primjene analitičkog postupka dobiti valjani rezultati. Prema zahtjevima dobre proizvođačke i laboratorijske prakse validacija je postala obaveza i profesionalna odgovornost analitičara. Validacija se provodi pri razvoju i uvođenju nove metode (ICH Q2(R1)). Kod promjene bilo kojeg dijela već validirane metode, prenamjene, poboljšanja ili prilagodbe postojeće metode potrebna je revalidacija. Također, revalidacija je nužna kod prenošenja metode u drugi laboratorij ili na drugi instrument, kod promjene u sintezi glavne komponente, promjene sastava gotovog proizvoda ili promjene analitičkog postupka. Sva načela koja se odnose na validaciju vrijede i kod revalidacije postupka ([www.fda.gov](http://www.fda.gov)).

### 1.2. Parametri validacije

Prije samog postupka validacije potrebno je definirati svrhu analitičke metode. Literatura ne opisuje točan postupak validacije već daje smjernice i regulatorne zahtjeve prema kojima analitičar oblikuje plan validacije (Tablica 1).

Međunarodna konferencija o harmonizaciji tehničkih zahtjeva za registraciju humanih lijekova (ICH) okuplja regulatorna tijela za lijekove i farmaceutsku industriju Europe, Japana i SAD-a s ciljem standardizacije parametara, zahtjeva i metodologije u validaciji analitičke metode. Osnovni parametri koji se uzimaju u obzir tijekom validacije su:

- Točnost
- Preciznost
- Specifičnost/selektivnost
- Granica dokazivanja
- Granica određivanja
- Linearnost i koncentracijsko područje
- Izdržljivost

U tablici 1 prikazani su parametri koje je potrebno validirati obzirom na cilj analitičkog postupka.

Tablica 1. Parametri u validaciji pojedinih analitičkih postupaka prema ICH-u

Parametar validacije	Identifikacija	Ispitivanje čistoće		Određivanje sadržaja
		Kvantitativno	Granično	
Točnost	-	+	-	+
Preciznost	-	+	-	+
Specifičnost	+	+	+	+
Granica dokazivanja	-	-	+	-
Granica određivanja	-	+	-	-
Linearnost	-	+	-	+
Radno područje	-	+	-	+

**Točnost** analitičke metode pokazuje slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. Za utvrđivanje točnosti provode se najmanje tri mjerenja uzorka za najmanje tri koncentracije u radnom području metode. Odstupanje od stvarne vrijednosti iskazuje se kao analitički prinos (engl. *recovery*)

$$R = \frac{\bar{x}}{\hat{x}} \cdot 100$$

gdje je  $\bar{x}$  srednja izmjerena vrijednost, a  $\hat{x}$  stvarna vrijednost analita u uzorku.

**Preciznost** pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja dobivenih višestrukim uzorkovanjem istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. Može se iskazati kao:

- ponovljivost (engl. *repeatability*) – označava podudaranje rezultata dobivenih istom metodom pod istim uvjetima u kratkom vremenskom intervalu
- srednja preciznost (engl. *intermediate precision*) – iskazuje odstupanje rezultata dobivenih pod različitim uvjetima u istom laboratoriju (različiti dani, analitičari, instrumenti)
- obnovljivost (engl. *reproducibility*) – izražava odstupanje rezultata dobivenih u različitim laboratorijima.

Preciznost se izražava statističkim veličinama kao standardno odstupanje, relativno standardno odstupanje (RSD, %) ili raspon pouzdanosti oko srednje vrijednosti.

**Specifičnost** analitičke metode je njezina sposobnost da nedvojbeno razlikuje samo jednu komponentu od ostalih prisutnih u uzorku. **Selektivnost** je definirana kao mogućnost metode da točno odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenata uzorka.

**Granica dokazivanja** je najniža koncentracija analita koja se može dokazati, ali ne i odrediti, prema zadanim uvjetima metode. **Granica određivanja** je najniža koncentracija analita u uzorku koja se može odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću pri propisanim uvjetima metode.

**Linearnost** analitičke metode predstavlja njezinu sposobnost da unutar određenog intervala daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Utvrđuje se kroz tri do šest mjerenja primjenom najmanje pet različitih koncentracija analita. Grafičkim prikazom ovisnosti izmjerenog analitičkog signala o koncentraciji analita dobiva se kalibracijska krivulja. Linearnost metode se izražava koeficijentom korelacije regresijskog pravca ( $k > 0,999$ ).

**Radno područje** mjerenja označava raspon između gornje i donje koncentracije analita u uzorku, uključujući i granične vrijednosti, unutar kojega primjena analitičke metode ima zadovoljavajuću točnost, preciznost i linearnost.

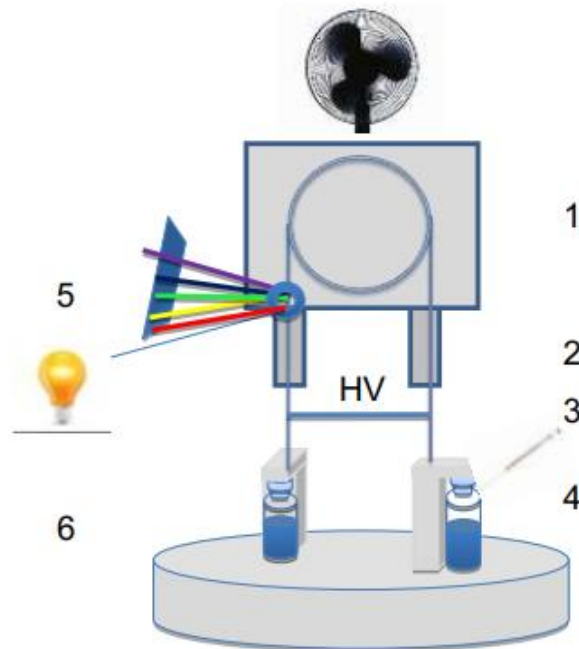
**Izdržljivost** analitičke metode je mjera njezine sposobnosti da ostane nepromjenjena pod utjecajem malih, ali namjernih, promjena parametara metode. Pokazatelj je pouzdanosti metode tijekom njezine normalne primjene uz male promjene uvjeta u kojima se realno provode analize (Nigović i sur., 2014).

### 1.3. Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza je separacijska tehnika u kojoj se sastavnice smjese odvajaju primjenom visokih potencijala (do 30 kV) u uskoj kapilari ispunjenoj mobilnom fazom. Uređaj za kapilarnu elektroforezu sastoji se od uske kapilare uronjene u dva spremnika za pufere i preko elektroda spojene na visokonaponski izvor istosmjerne struje (Slika 1). Najčešće se koriste kvarcne kapilare unutarnjeg promjera od 50 do 300  $\mu\text{m}$  i duljine od 10 do



100 cm. Kapilara mora biti termostatorirana da se izbjegne zagrijavanje uslijed pojačanja jakosti struje. Uzorak se u kapilaru unosi pod tlakom pomoću automatiziranog sustava za unošenje uzoraka. Kapilarna elektroforeza može koristiti više vrsta detektora, a najčešće se koriste UV-Vis detektor, DAD detektor i maseni spektrometar.



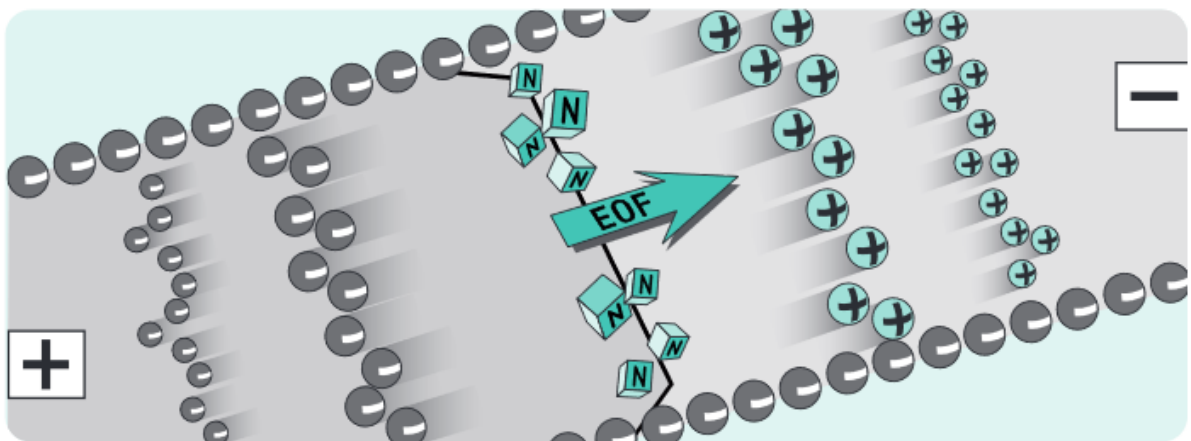
Slika 1. Shema instrumenta za kapilarnu elektroforezu: termostatorirana kapilara (1), dvije elektrode (2), visokonaponski izvor istosmjerne struje (3), sustav za unošenje uzoraka (4), detektor (5), dva spremnika za pufere (6). (Sertić 2013)

Djelovanjem električnog polja, sastavnice smjese, putuju kapilaram prema jednoj od elektroda, različitom brzinom, ovisno o njihovom naboju i ionskom radijusu. Brzina putovanja čestica opisana je izrazom:

$$v_{ep} = \mu_{ep} E = \frac{q}{6\pi\eta r} \cdot \frac{V}{L}$$

gdje je  $v_{ep}$  brzina putovanja iona,  $\mu_{ep}$  je elektroforetska pokretljivost čestice,  $E$  je jakost primjenjenog električnog polja,  $q$  je naboj čestice,  $r$  je polumjer čestice,  $\eta$  je viskoznost otopine elektrolita,  $V$  je primjenjeni napon u voltima, a  $L$  je duljina kapilare u centimetrima.

Neutralni analiti se također mogu analizirati kapilarnom elektroforezom jer će putovati kroz kapilaru zbog elektroosmotskog toka. Elektroosmotski tok je tok samog pufera. Nastaje zbog djelovanja električnog polja na električni dvosloj koji nastaje uz površinu unutrašnje stijenke kapilare (Slika 2). Specifičnost elektroosmotskog toka u kapilari je ravan profil toka koji za razliku od laminarnog ili parabolnog toka ne pridonosi disperziji zona analita. Također, prednost elektroosmotskog toka je kretanje svih analita u istom smjeru, neovisno o naboju (Damić i Nigović, 2010). Postoji više vrsta kapilarno elektroforetskih tehnika koje se razlikuju prema mehanizmu razdvajanja različitih analita (Tablica 2) (Sertić, 2013).



Slika 2. Elektroosmotski tok

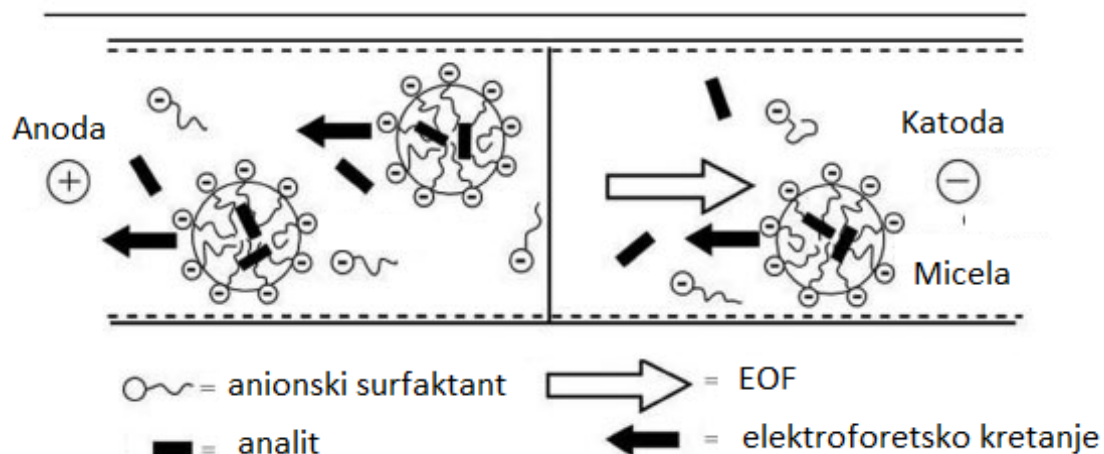
Tablica 2. Vrste kapilarne elektroforeze

Vrsta kapilarne elektroforeze	Vrsta analita
Kapilarna zonska elektroforeza (CZE)	Nabijeni analiti
Kapilarna gel elektroforeza (CGE)	DNA, RNA, proteini
Micelarna elektrokinetička kromatografija (MEKC)	Neutralni i nabijeni analiti
Kapilarno izoelektrično fokusiranje (CIEF)	Proteini i peptidi
Kapilarna izotahoforeza (CITP)	Ioni
Kiralna kapilarna elektroforeza (CCE)	Kiralne molekule
Kapilarna elektrokromatografija (CEC)	Male molekule
Mikroemulzijska elektrokinetička kromatografija (MEEKC)	Analiti slabo topljivi u vodi
Nevodena kapilarna elektroforeza (NACE)	Analiti netopljivi u vodi

### 1.3.1. Micelarna elektrokinetička kromatografija (MEKC)

Micelarna elektrokinetička kromatografija je vrlo prikladna u analizi lijekova jer ima sposobnost odvajanja neutralnih i nabijenih analita ([www.link.springer.com](http://www.link.springer.com)). Uvjet za odvajanje neutralnih analita je postojanje micela u radnom puferu. Micele nastaju kada se u radni pufer doda površinski aktivna tvar pri koncentraciji većoj od kritične micelarne koncentracije. Molekula površinski aktivne tvari sastoji se od dugolančanog hidrofobnog repa i hidrofilne glave. Repovi se orijentiraju prema središtu, a glave prema površini micela gdje su u kontaktu s hidrofilnim puferom. Neutralni spojevi različito međudjeluju s micelama i prema tome se razdvajaju. Brzina putovanja neutralnog analita ovisi o koeficijentu distribucije između micela i vodene otopine dok kretanje nabijenog analita ovisi i o njegovoj elektroforetskoj pokretljivosti bez micela. Zbog ovisnosti razdvajanja analita o koeficijentu distribucije između micela i vodene otopine ova tehnika se naziva kromatografija. Micele čine pseudostacionarnu fazu, a pufer mobilnu fazu. Analiti mogu međudjelovati s micelama putem hidrofobnih i elektrostatskih interakcija. Što su interakcije s micelom jače, to je duže zadržavanje analita u kapilari (Slika 3) (Hancu i sur., 2013).

Surfaktanti koji se koriste u MEKC-u moraju biti topljivi u puferu kako bi mogli tvoriti micela. Micelarna otopina mora biti homogena, transparenta i niske viskoznosti (Hancu i sur., 2013). Najčešće korištena površinski aktivna tvar je natrijev dodecil sulfat (SDS). To je anionski surfaktant čije micela putuju prema anodi. Pri neutralnom ili bazičnom pH elektroosmotski tok je brži od putovanja micela pa je ukupno kretanje prema katodi i detektoru (Sertić, 2016).

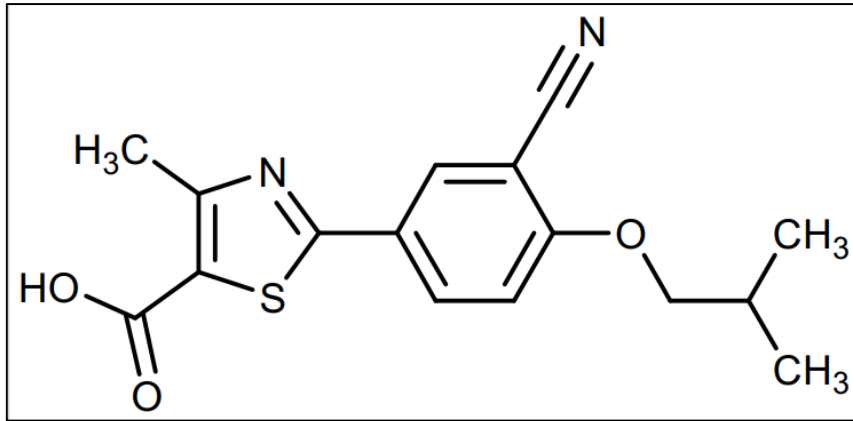


Slika 3. Princip razdvajanja u micelarnoj elektrokinetičkoj kromatografiji.

Micelarna elektrokinetička kromatografija dobro prikazuje prilagodljivost i raznovrsnost kapilarne elektroforeze, gdje se upotrebom istog instrumenta, uz modifikacije pufera omogućuje razdvajanje vrlo različitih analita.

#### 1.4. Febuksostat

Metabolizam purina kod ljudi se odvija putem kaskade hipoksantin → ksantin → mokraćna kiselina. Oba koraka navedena u kaskadi katalizira enzim ksantin oksidaza. Febuksostat je novi lijek, nepurinski inhibitor ksantin oksidaze, koji se koristi u terapiji kronične hiperuricemije. Slika 4 prikazuje njegovu strukturnu formulu. Febuksostat nekompetitivno blokira aktivno mjesto enzima i onemogućuje vezanje supstrata. Snažno i selektivno inhibira oksidirane i reducirane oblike ksantin oksidaze i posljedično smanjuje razinu mokraćne kiseline u serumu (Mukthinuthalapati i sur., 2013). U kliničkim ispitivanjima je pokazao veću učinkovitost u snižavanju mokraćne kiseline u serumu u odnosu na stariji lijek alopurinol (Cutolo i sur., 2017).



Slika 4. Strukturna formula febuksostata

## 2. Obrazloženje teme

U istraživanjima koja su prethodila ovom radu razvijena je brza, jednostavna i pouzdana metoda za istovremeno određivanje febuksostata i tri njegova onečišćenja micelarnom elektrokinetičkom kromatografijom. Cilj ovoga rada bio je ispitati validacijske parametre, linearnost i preciznost, za novorazvijenu analitičku metodu i utvrditi njezinu prikladnost za istovremeno određivanje febuksostata i njegova tri onečišćenja, febuksostat amida, febuksostat DEE i etil-febuksostata, u gotovom ljekovitom obliku.

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Kemikalije

- Otopina natrijeva hidroksida 1 M (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Ultračista voda pripremljena WaterPro sustavom za pročišćavanje vode (Labconco, Kansas City, MI, SAD)
- Natrijev dodecil sulfat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Natrijev tetraborat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Acetonitril, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Dimetilsulfoksid (Merck, Darmstadt, Njemačka)

##### 3.1.2. Standardi

- Febuksostat (Pliva Hrvatska d.o.o.)
- Ketoprofen (Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Etil febuksostat (etil 2-[3-cijano-4-izobutoksifenil]-4-metiltiazol-5-karboksilat) (Pliva Hrvatska d.o.o.)
- Febuksostat amid (2-[3-karbamoil-4-izobutoksifenil]-4-metiltiazol-5-karboksilna kiselina) (Pliva Hrvatska d.o.o.)
- Febuksostat DEE (2-[3-(etoksikarbonil)-4-izobutoksifenil]-4-metiltiazol-5-karboksilna kiselina) (Pliva Hrvatska d.o.o.)

##### 3.1.3. Radni instrumenti

- Uređaj za kapilarnu elektroforezu (G1600A) s integriranim nizom dioda (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

##### 3.1.4. Pribor

- Analitička vaga, model AG245 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Ultrazvučna kupelj (Elma, Singen, Njemačka)
- Sustav za pročišćavanje vode SG Water euRO (SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Germany)
- Pipeta, model Pipet-Lite XLS (0,5-10 $\mu$ L) (Rainin Instrument LLC, Oakland, CA, SAD)

- Kapilare od izvučenog kvarca različitih duljina, unutrašnjeg promjera 50  $\mu\text{m}$ , produljenog optičkog puta 150  $\mu\text{m}$  (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Bočice za uzorkovanje sustavom za kapilarnu elektroforezu (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Celulozni nitratni injekcijski filteri za filtraciju veličine pora 0.45  $\mu\text{m}$  (Sartorius, Goettingen, Njemačka)

#### 3.1.5. Programski paketi

- 3D-CE/MSD ChemStation, verzija A 10.02 (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft, Seattle, WA, SAD)

### 3.2. Metode

#### 3.2.1. Priprema radnog pufera

U odmjernu tikvicu od 50 mL odvažuje se 1,9096 g natrijevog tetraborata i nadopuni do oznake ultračistom vodom. Dobivena je otopina boratnog pufera koncentracije 100 mM. Točan pH (9,1) dobivenog pufera određen je pH-metrom. Otopina SDS-a koncentracije 100 mM pripremi se vaganjem 1,4419 g u odmjernoj tikvici od 50 mL i nadopunjavanjem do oznake ultračistom vodom. Obje otopine izložene su ultrazvučnoj kupelji tijekom pet minuta kako bi se poboljšala topljivost krutih tvari. Prije upotrebe u analizi otopine se filtriraju kroz membranski filter veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$ . Miješanjem odgovarajućih volumena otopine boratnog pufera, otopine SDS-a i ultračiste vode dobiva se željena koncentracija otopine radnog pufera. Radne otopine pufera se pripremaju svježe svakih 6 mjerenja.

#### 3.2.2. Priprema standardnih otopina

Standardne otopine febeksostata, etil febeksostata i DEE-a pripremljene su otapanjem supstanci u acetonitrilu do koncentracije 0,5 mg/mL. Standardna otopina febeksostat amida pripremljena je otapanjem supstance u dimetilsulfoksidu (DMSO) da koncentracija bude 0,5 mg/mL. Unutarnji standard, ketoprofen, otopljen je u acetonitrilu. Koncentracija standardne otopine ketoprofena također iznosi 0,5 mg/mL.



### 3.2.3. Priprema instrumenta

Prije prvog korištenja kapilara se kondicionira ispiranjem s metanolom 10 minuta, zatim s 1 M NaOH 10 minuta i vodom 10 minuta. Nakon toga kapilara se uravnoteži ispiranjem otopinom radnog pufera u trajanju od 20 minuta. Na početku radnog dana, već korištena kapilara kondicionira se ispiranjem s 0,1 M NaOH 10 minuta, vodom 10 minuta i otopinom radnog pufera 10 min. Kako bi se osigurala ponovljivost rezultata prije svake analize kapilara se ispire otopinom radnog pufera 3 min. Nakon analize kapilara se ispire s ACN:voda (50:50, v/v) i 0,1 M NaOH 1 minutu. Otopine radnog pufera se zamjene svježe pripremljenim otopinama svakih 6 mjerenja. Na kraju radnog dana kapilara se ispire vodom tijekom 20 minuta. Elektrode se prije isključivanja instrumenta urone u bočice s ultračistom vodom.

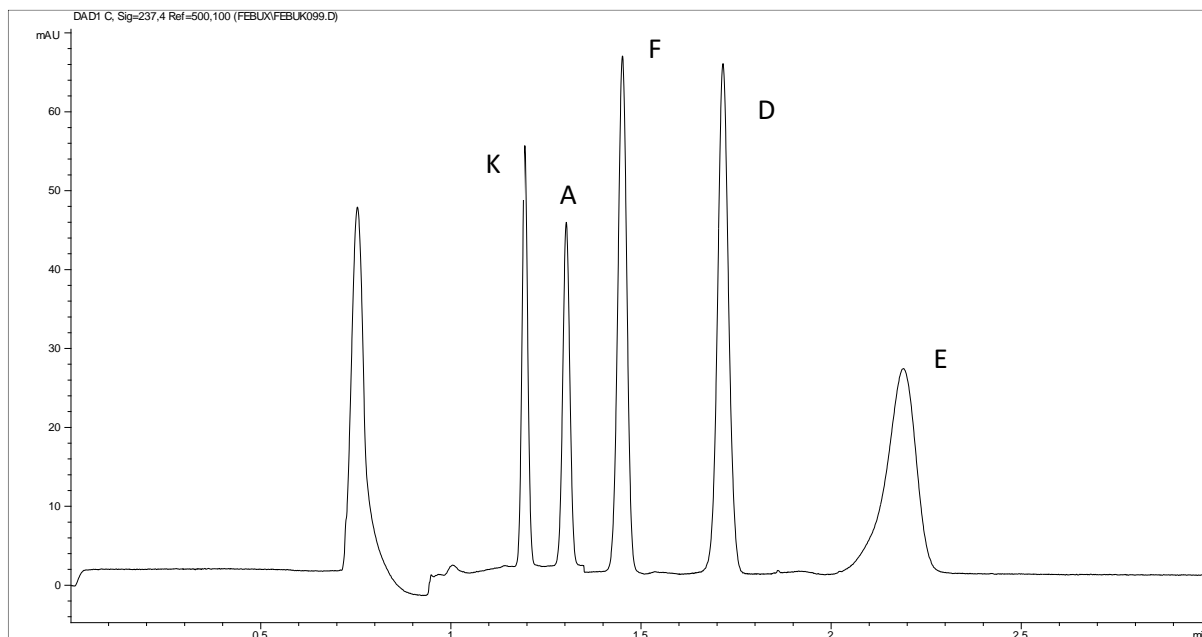
### 3.2.4. Analiza uzorka

Analiza se provodi na uređaju za kapilarnu elektroforezu. Koriste se kapilare od izvučenog kvarca, unutarnjeg promjera 50  $\mu\text{m}$ , različite duljine. Kako bi se povećala osjetljivost metode koriste se takozvane *bubble cell* kapilare. Takve kapilare na mjestu detektora imaju proširenje koje povećava optički put detektora (150  $\mu\text{m}$ ) i omogućuje niže pragove detekcije. Otopine radnih pufera pripreme se u 3 bočice. Jedna se koristi za ispiranje kapilare između analiza, a u druge dvije su uronjene elektrode tijekom analize. Korišten je radni pufer sastava 20 mM boratni pufer i 50 mM natrijev dodecil sulfat. Uzorci se pripremaju razrjeđivanjem do željene koncentracije smjesom otapala ACN:H<sub>2</sub>O = 50:50, v/v i injektiraju se hidrodinamski pri 50 mbar, 4 s. Primijenjeni napon iznosi 28 kV. Separacija se provodi pri stalnoj temperaturi kapilare 25 °C. Analiza se provodi pri valnoj duljini 237 nm.

#### 4. Rezultati i rasprava

Kapilarna elektroforeza je tehnika koja se odlikuje brojnim prednostima, poput kratkog vremena analize, potrebnih malih volumena otapala i uzoraka što ju čini ekološki prihvatljivom, različitih mehanizama razdvajanja koji omogućuju analizu vrlo različitih analita, visoke učinkovitosti, jednostavna je i potpuno automatizirana. No dva su glavna nedostatka tehnike, a to su slabija osjetljivost u odnosu na najčešće korištenu tehniku tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i lošija ponovljivost uslijed promjena koje se događaju na unutrašnjoj stijenci kapilare. To rezultira promjenama u vremenu migracije i površini pika analita. U tu svrhu se u kapilarnoj elektroforezi u pravilu, kao i u plinskoj kromatografiji, koristi unutrašnji standard. Unutrašnji standard mora biti molekula što sličnije kemijske strukture analitima i imati što sličnije vrijeme migracije. U ovom diplomskom radu odabran je ketoprofen, derivat propionske kiseline, koji je pokazao i dobar odaziv DAD detektora na željenoj valnoj duljini, bio je dobro razdvojen od analita interesa i nije produžavao dodatno trajanje analitičke metode, već je dapače eluirao prvi. Na slici 5 prikazan je elektroferogram smjese standardnih otopina febuksostata, DEE-a, febuksostat amida, etil febuksostata i unutrašnjeg standarda ketoprofena.

Tijekom validacije kapilarnoelektroforetske metode unutrašnji standard se koristi za korekciju i vremena migracije i površine pika analita, tako da su korigirane površine ( $A' = A_{\text{analita}}/A_{\text{un. stand.}}$ ) i korigirana vremena ( $t' = t_{\text{analita}}/t_{\text{un. stand.}}$ ) korištene u određivanju validacijskih parametara.



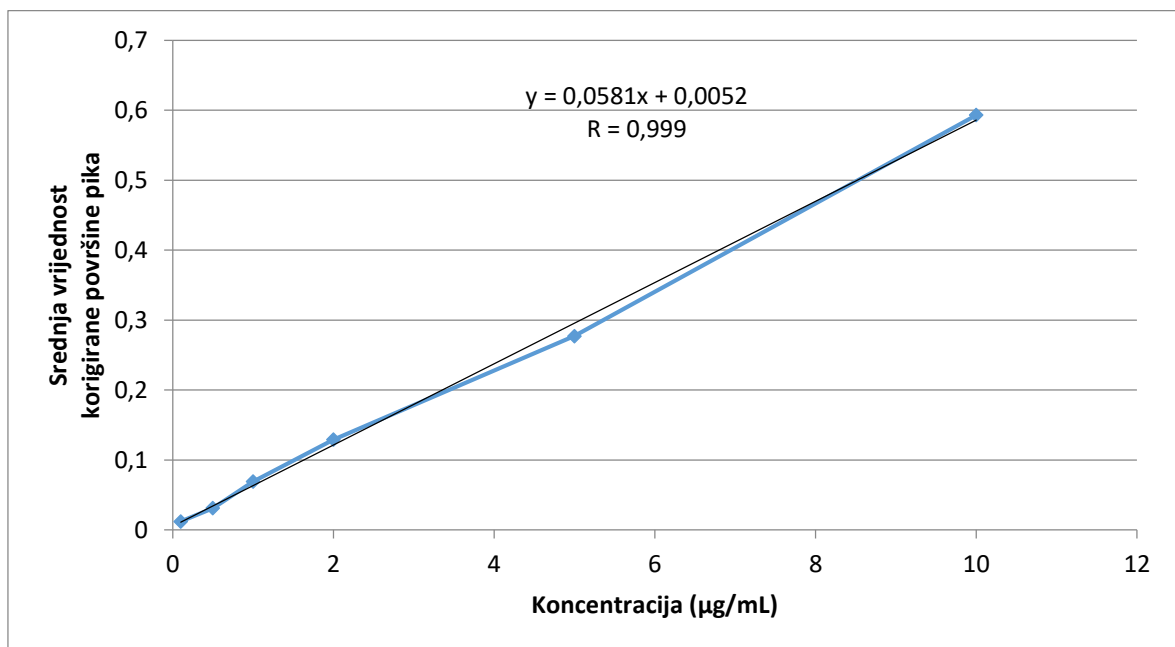
Slika 5. Elektroferogram smjese standardnih otopina febeksostata ( $\gamma=50 \mu\text{g/mL}$ ), DEE-a ( $\gamma=50 \mu\text{g/mL}$ ), febeksostat amida ( $\gamma=50 \mu\text{g/mL}$ ), etil febeksostata ( $\gamma=50 \mu\text{g/mL}$ ) uz dodatak unutrašnjeg standarda ketoprofena ( $\gamma=50 \mu\text{g/mL}$ );

Uvjeti analize: 20 mM boratni pufer, 50 mM SDS, 28 kV, valna duljina detekcije: 237 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 4 s; pikovi: febeksostat (F), ketoprofen (K), DEE (D), febeksostat amid (A) i etil febeksostat (E)

#### 4.1. Ispitivanje linearnosti metode

##### 4.1.1. Ispitivanje linearnosti metode za febeksostat amid

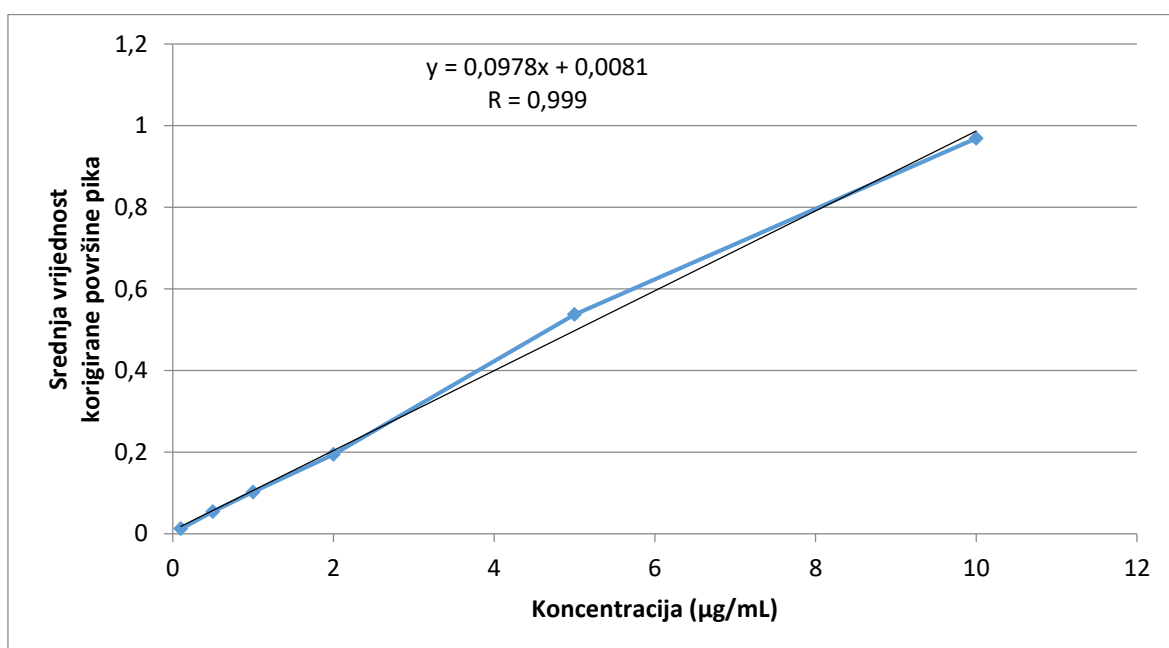
Otopine febeksostat amida priređene su u koncentracijskom rasponu od 0,1 do 20,0 µg/mL. Ovisnost srednjih vrijednosti korigirane površine pika (omjer površine pika analita i pika unutarnjeg standarda) o koncentraciji febeksostat amida prikazana je na Slici 6. Metoda se pokazala linearnom za febeksostat amid u koncentracijskom rasponu od 0,1 do 10,0 µg/mL. Iz grafičkog prikaza dobiven je regresijski pravac čija jednadžba glasi  $y = 0,0581x + 0,0052$  sa koeficijentom korelacije  $R = 0,999$ .



Slika 6. Ovisnost srednje vrijednosti korigirane površine pika o koncentraciji febeksostat amida

#### 4.1.2. Ispitivanje linearnosti metode za febeksostat DEE

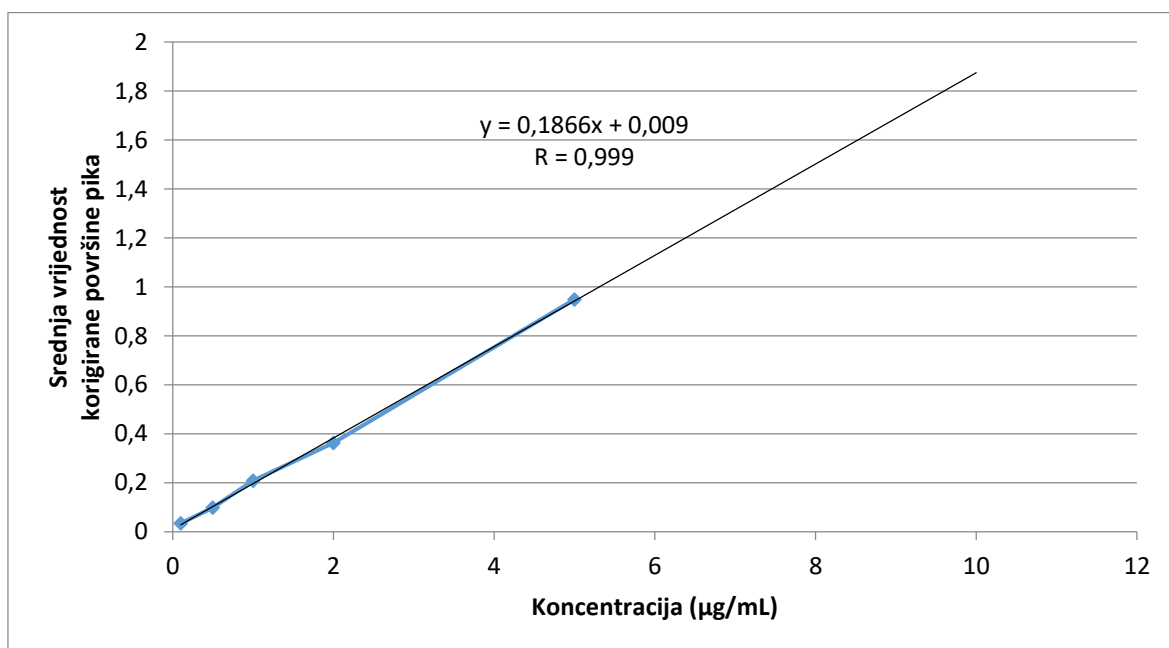
Otopine febeksostat DEE priređene su u koncentracijskom rasponu od 0,1 do 20,0 µg/mL. Ovisnost srednjih vrijednosti korigirane površine pika (omjer površine pika analita i pika unutarnjeg standarda) o koncentraciji febeksostat DEE prikazana je na Slici 7. Metoda se pokazala linearnom za febeksostat DEE u koncentracijskom rasponu od 0,1 do 10,0 µg/mL. Iz grafičkog prikaza dobiven je regresijski pravac čija jednačba glasi  $y = 0,0978x + 0,0081$  sa koeficijentom korelacije  $R = 0,999$ .



Slika 7. Ovisnost srednje vrijednosti korigirane površine pika o koncentraciji febeksostat DEE

#### 4.1.3. Ispitivanje linearnosti metode za etil feboksostat

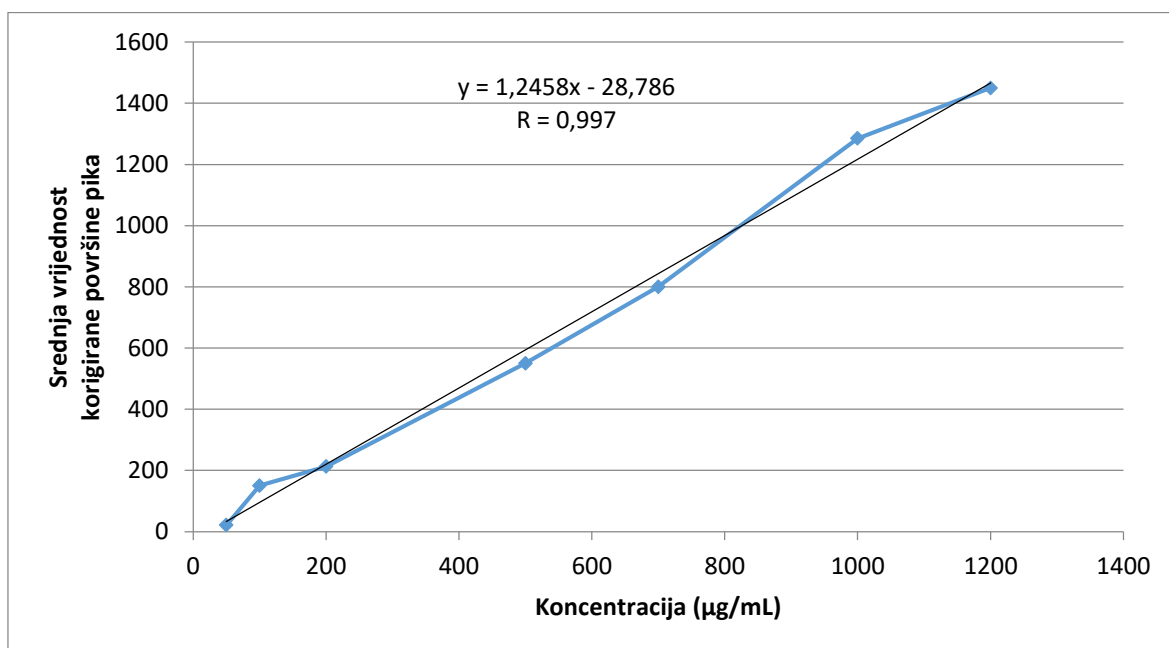
Otopine etil feboksostata priređene su u koncentracijskom rasponu od 0,1 do 20,0 µg/mL. Ovisnost srednjih vrijednosti korigirane površine pika (omjer površine pika analita i pika unutarnjeg standarda) o koncentraciji feboksostat DEE prikazana je na Slici 8. Metoda se pokazala linearnom za feboksostat DEE u koncentracijskom rasponu od 0,1 do 5,0 µg/mL. Iz grafičkog prikaza dobiven je regresijski pravac čija jednadžba glasi  $y = 0,1866x + 0,009$  sa koeficijentom korelacije  $R = 0,999$ .



Slika 8. Ovisnost srednje vrijednosti korigirane površine pika o koncentraciji etil feboksostata

#### 4.1.4. Ispitivanje linearnosti metode za febeksostat

Otopine febeksostata priređene su u koncentracijskom rasponu od 100,0 do 1200,0  $\mu\text{g/mL}$ . Ovisnost srednjih vrijednosti korigirane površine pika (omjer površine pika analita i pika unutarnjeg standarda) o koncentraciji febeksostata prikazana je na Slici 9. Metoda se pokazala linearnom za febeksostat u spomenutom koncentracijskom rasponu. Iz grafičkog prikaza dobiven je regresijski pravac čija jednadžba glasi  $y = 1,2458x - 28,786$  sa koeficijentom korelacije  $R = 0,997$ .



Slika 9. Ovisnost srednje vrijednosti korigirane površine pika o koncentraciji febeksostata

#### 4.2. Ispitivanje ponovljivosti metode

Ponovljivost analitičke metode se određuje mjerenjem 6 uzastopnih analiza te određivanjem srednje vrijednosti dobivenih rezultata za korigirano vrijeme migracije i korigiranu površinu pikova. Korigirano vrijeme migracije izračuna se pomoću vremena migracije unutrašnjeg standarda ketoprofena ( $t' = t_{\text{analita}}/t_{\text{ketoprofena}}$ ). Korigirana vrijednost površine pika izračuna se pomoću površine pika unutrašnjeg standarda ketoprofena ( $A' = A_{\text{analita}}/A_{\text{ketoprofena}}$ ). Iz korigiranih vrijednosti rezultata izračunaju se srednje vrijednosti, SD i RSD. Rezultati su prikazani u tablicama.

##### 4.2.1. Ispitivanje ponovljivosti za febeksostat amid

RSD vrijednosti (0,84% i 1,00%) zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti za preciznost.

Tablica 3. Srednja vrijednost vremena zadržavanja za ispitivanu otopinu febeksostata amida, standardna devijacija i relativna standardna devijacija

$t_{Rsr}$	SD	RSD (%)
1,525	0,02	0,84

Tablica 4. Srednje vrijednosti površine pika za ispitivanu otopinu febeksostat amida, standardna devijacija i relativna standardna devijacija

$A_{sr}$	SD	RSD (%)
76,30	0,13	1,00



#### 4.2.2. Ispitivanje ponovljivosti za febeksostat DEE

RSD vrijednosti dobivene u ispitivanju ponovljivosti za febeksostat DEE zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti za preciznost.

Tablica 5. Srednja vrijednost vremena zadržavanja za ispitivanu otopinu febeksostat DEE, standardna devijacija i relativna standardna devijacija

$t_{Rsr}$	SD	RSD (%)
1,943	0,06	1,31

Tablica 6. Srednje vrijednosti površine pika za ispitivanu otopinu febeksostat DEE, standardna devijacija i relativna standardna devijacija

$A_{sr}$	SD	RSD (%)
63,7	0,25	1,58

#### 4.2.3. Ispitivanje ponovljivosti za etil febuksostat

Mjerenjem 6 uzastopnih analiza dobiveni su rezultati ponovljivosti za etil febuksostat. RSD vrijednosti nešto su lošije ali zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti za preciznost.

Tablica 7. Srednja vrijednost vremena zadržavanja za ispitivanu otopinu etil febuksostata, standardna devijacija i relativna standardna devijacija

$t_{Rsr}$	SD	RSD (%)
3,521	0,31	1,37

Tablica 8. Srednje vrijednosti površine pika za ispitivanu otopinu etil febuksostata, standardna devijacija i relativna standardna devijacija

$A_{sr}$	SD	RSD (%)
65,90	0,88	2,85

#### 4.2.4. Ispitivanje ponovljivosti za febeksostat

Rezultati ispitivanja ponovljivosti za febeksostat prikazane su u tablicama. Dobivene RSD vrijednosti zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti za preciznost.

Tablica 9. Srednja vrijednost vremena zadržavanja za ispitivanu otopinu febeksostata, standardna devijacija i relativna standardna devijacija

$t_{Rsr}$	SD	RSD (%)
1,74	0,19	0,89

Tablica 10. Srednje vrijednosti površine pika za ispitivanu otopinu febeksostata, standardna devijacija i relativna standardna devijacija

$A_{sr}$	SD	RSD (%)
101,6	0,21	1,11

Preciznost metode je određena kao ponovljivost. Izražene su relativna standardna odstupanja za korigirano vrijeme migracije i korigiranu površinu pikova analita. Dobivene RSD vrijednosti za vrijeme migracije iznosile su između 0,84-1,37 %, a za površinu pika 1,00-2,85 %. Očekivano, najveća odstupanja dobivena su za pik onečišćenja etil febeksostata koji je nepolarno onečišćenje i najviše stupa u interakcije s micelama natrijevog dodecil sulfata, koji migrira zadnji od svih analita i ujedno je pik s najlošijom simetrijom. Rezultati ukazuju na to da je preciznost predložene micelarne elektrokinetičke kromatografske metode zadovoljavajuća.

## 5. Zaključci

U ovom diplomskom radu za novorazvijenu kapilarnoelektroforetsku metodu za istovremenu analizu febuksostata i njegova tri onečišćenja, febuksostat amid, febuksostata DEE i etil-febuksostata u gotovom ljekovitom obliku, ispitani su validacijski parametri linearnost i preciznost. Korištena je micelarna elektrokinetička kromatografska metoda, primjenom radnog pufera sastava 20 mM boratni pufer pH 9,3 i 50 mM natrijev dodecil sulfat. Uzorci su injektirani hidrodinamski pri 50 mbar tijekom 4 s. Analiza je provođena pri separacijskom naponu 28 kV, temperaturi 25 °C te valnoj duljini 237 nm.

Metoda je linearna za febuksostat amid i febuksostat DEE u području koncentracija od 0,1 do 10 µg/mL, dok je za etil febuksostat linearna u rasponu koncentracija od 0,1 do 5 µg/mL. Za febuksostat metoda je linearna u području koncentracija od 100 do 1200 µg/mL.

Preciznost metode je određena kao ponovljivost. Izražene su relativna standardna odstupanja za korigirano vrijeme migracije i korigiranu površinu pikova analita. Dobivene RSD vrijednosti za vrijeme migracije iznosile su između 0,84-1,37 %, a za površinu pika 1,00-2,85 %. Očekivano, najveća odstupanja dobivena su za pik onečišćenja etil febuksostata koji je nepolarno onečišćenje i najviše stupa u interakcije s micelama natrijevog dodecil sulfata, pa migrira zadnji od svih analita i ujedno je pik s najlošijom simetrijom. Rezultati ukazuju na to da je preciznost predložene micelarne elektrokinetičke kromatografske metode zadovoljavajuća. Predlaže se ispitivanje dodatnih parametara kako bi metoda bila u potpunosti validirana.

## 6. Literatura

1. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics, 2015, <https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm265700.htm>, pristupljeno 19.4.2018.
2. Cutolo M, Cimmino MA, Perez-Ruiz F. Potency on lowering serum uric acid in gout patients: a pooled analysis of registrative studies comparing febuxostat vs. allopurinol, *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21 - N. 18, 4186-4195.
3. Damić M, Nigović B. Kapilarna elektroforeza u farmaciji. *Farm Glas*, 2010, 66, 195-207.
4. Hancu G, Simon B, Rusu A, Mircia E, Gyeresi A. Principles of Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography Applied in Pharmaceutical Analysis. *Adv Pharm Bull*, 2013, 3(1), 1-8.
5. Heiger D. High performance capillary electrophoresis. Germany, Agilent Technologies, 2000, str. 62-67.
6. 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, 931-938.
7. Nigovic B, Damic M, Injac R, Kočevlar Glavač N, Štrukelj B. Analysis of atorvastatin and related substances by MEKC. *Chromatographia*, 2009, 69, 1299-1305.
8. Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodriguez J, Mornar Turk A, Sertić M. Analitika lijekova - Praktikum. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2014, str. 135-138.
9. Sertić M. Nove kapilarno elektroforetske i kromatografske metode u analitici statina, Doktorska disertacija, Zagreb, 2013, str. 11-20.
10. Sertić M. Određivanje onečišćenja u lijekovima kapilarnom elektroforezom. Specijalistički rad, Zagreb 2016, str. 16-33.
11. Validation of analytical procedure: text and methodology, International Conference on Harmonisation, Q2(R1), 2005, [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf), pristupljeno 6.7.2018.

## 7. Sažetak/Summary

### 7.1. Sažetak

Validacija analitičke metode je proces kojim se određuje i dokumentira prikladnost analitičke metode za određenu primjenu. Osnovni parametri koji se uzimaju u obzir tijekom validacije su: točnost, preciznost, specifičnost/selektivnost, granica dokazivanja, granica određivanja, linearnost i koncentracijsko područje i izdržljivost.

Cilj ovoga rada bio je ispitati validacijske parametre za novorazvijenu analitičku metodu i utvrditi njezinu prikladnost za istovremeno određivanje febeksostata i njegova tri onečišćenja, febeksostat amida, febeksostat DEE i etil-febeksostata, u gotovom ljekovitom obliku. Febeksostat je inhibitor ksantin oksidaze, lijek koji se koristi u liječenju kronične hiperuricemije. Korištena je micelarna elektrokinetička kromatografija, separacijska tehnika koja ima sposobnost odvajanja neutralnih i nabijenih analita. Kod validacije analitičke metode ispitana je linearnost metode te preciznost metode izražena kao ponovljivost.

Metoda je linearna za febeksostat amid i febeksostat DEE u području koncentracija od 0,1 do 10  $\mu\text{g/mL}$ , dok je za etil febeksostat linearna u rasponu koncentracija od 0,1 do 5  $\mu\text{g/mL}$ . Za febeksostat metoda je linearna u području koncentracija od 100 do 1200  $\mu\text{g/mL}$ .

Preciznost metode je određena kao ponovljivost. Izražene su relativna standardna odstupanja za korigirano vrijeme migracije i korigiranu površinu pikova analita. Dobivene RSD vrijednosti za vrijeme migracije iznosile su između 0,84-1,37 %, a za površinu pika 1,00-2,85 %.

Očekivano, najveća odstupanja dobivena su za pik onečišćenja etil febeksostata koji je nepolarno onečišćenje i najviše stupa u interakcije s micelama natrijevog dodecil sulfata, pa migrira zadnji od svih analita i ujedno je pik s najlošijom simetrijom. Rezultati ukazuju na to da je preciznost predložene micelarne elektrokinetičke kromatografske metode zadovoljavajuća. Predlaže se ispitivanje dodatnih parametara kako bi metoda bila u potpunosti validirana.

## 7.2. Summary

Validation of analytical method is a process used to confirm that the analytical procedure employed for a specific test is suitable for its intended use. Typical validation characteristics which should be considered are: accuracy, precision, specificity, limit of detection, limit of quantitation, linearity, range and robustness.

The objective was method validation for simultaneous determination of febuxostat and its impurities, febuxostat amide, febuxostat DEE and ethyl febuxostat in pharmaceutical formulations. Febuxostat is a xanthine oxidase inhibitor, the new drug used in chronic hyperuricemia treatment. In this paper the method for determination of febuxostat and its impurities was validated. The technique used for determination was micellar electrokinetic chromatography. Parameters tested for validation were linearity and intermediate precision.

Method is linear for febuxostat amide and febuxostat DEE in concentration range from 0.1 to 10.0  $\mu\text{g/mL}$ , and for ethyl febuxostat in range from 0.1 to 5.0  $\mu\text{g/mL}$ . For febuxostat linearity is in range from 100.0 – 1200.0  $\mu\text{g/mL}$ .

Method precision is demonstrated as repeatability. Relative standard deviation for migration time and peak areas were presented. RSD values for migration time were from 0.84 to 1.37 % and for peak areas were from 1.00 to 2.85 %. Greatest aberrations were for peak areas for ethyl febuxostat. Ethyl febuxostat is a neutral impurity that interacts most with the inner capillary wall so its peaks have bad symmetry. Results suggest that the precision of the proposed method is satisfactory.

**8. Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card**



## 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

### VALIDACIJA MICELARNO ELEKTROKINETIČKE KROMATOGRAFSKE METODE ZA ODREĐIVANJE ONEČIŠĆENJA FEBUKSOSTATA U LJEKOVITOM OBLIKU

**Laura Horvat**

#### SAŽETAK

Validacija analitičke metode je proces kojim se određuje i dokumentira prikladnost analitičke metode za određenu primjenu. Osnovni parametri koji se uzimaju u obzir tijekom validacije su: točnost, preciznost, specifičnost/selektivnost, granica dokazivanja, granica određivanja, linearnost i koncentracijsko područje i izdržljivost.

Cilj ovoga rada bio je ispitati validacijske parametre za novorazvijenu analitičku metodu i utvrditi njezinu prikladnost za istovremeno određivanje febuksostata i njegova tri onečišćenja, febuksostat amida, febuksostat DEE i etil-febuksostata, u gotovom ljekovitom obliku. Febuksostat je inhibitor ksantin oksidaze, lijek koji se koristi u liječenju kronične hiperuricemije. Korištena je micelarna elektrokinetička kromatografija, separacijska tehnika koja ima sposobnost odvajanja neutralnih i nabijenih analita. Kod validacije analitičke metode ispitana je linearnost metode te preciznost metode izražena kao ponovljivost.

Metoda je linearna za febuksostat amid i febuksostat DEE u području koncentracija od 0,1 do 10,0 µg/mL, dok je za etil febuksostat linearna u rasponu koncentracija od 0,1 do 5,0 µg/mL. Za febuksostat metoda je linearna u području koncentracija od 100,0 do 1200,0 µg/mL.

Preciznost metode je određena kao ponovljivost. Izražene su relativna standardna odstupanja za korigirano vrijeme migracije i korigiranu površinu pikova analita. Dobivene RSD vrijednosti za vrijeme migracije iznosile su između 0,84-1,37 %, a za površinu pika 1,00-2,85 %. Očekivano, najveća odstupanja dobivena su za pik onečišćenja etil febuksostata koji je nepolarno onečišćenje i najviše stupa u interakcije s micelama natrijevog dodecil sulfata, koji migrira zadnji od svih analita i ujedno je pik s najlošijom simetrijom. Rezultati ukazuju na to da je preciznost predložene micelarne elektrokinetičke kromatografske metode zadovoljavajuća.

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

Rad sadrži: 26 stranica, 9 grafičkih prikaza, 10 tablica i 11 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Validacija, micelarna elektrokinetička kromatografija, febuksostat

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. Petra Turčić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Kristina Pavić**, *asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2018.

## 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

### VALIDATION OF MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY METHOD FOR DETERMINATION OF FEBUXOSTAT AND ITS IMPURITIES IN PHARMACEUTICAL FORMULATION

Laura Horvat

#### SUMMARY

Validation of analytical method is a process used to confirm that the analytical procedure employed for a specific test is suitable for its intended use. Typical validation characteristic which should be considered are: accuracy, precision, specificity, limit of detection, limit of quantitation, linearity, range and robustness.

The objective was method validation for simultaneous determination of febuxostat and its impurities, febuxostat amide, febuxostat DEE and ethyl febuxostat in pharmaceutical formulations. Febuxostat is a xanthine oxidase inhibitor, the new drug used in chronic hyperuricemia treatment. In this paper the method for determination of febuxostat and its impurities was validated. The technique used for determination was micellar electrokinetic chromatography. Parameters tested for validation were linearity and intermediate precision.

Method is linear for febuxostat amid and febuxostat DEE in concentration range from 0.1 to 10.0 µg/mL, and for ethyl febuxostat in range from 0.1 to 5.0 µg/mL. For febuxostat linearity is in range from 100.0 – 1200.0 µg/mL.

Method precision is demonstrated as repeatability. Relative standard deviation for migration time and peak areas were presented. RSD values for migration time were from 0.84 to 1.37 % and for peak areas were from 1.00 to 2.85 %. Greatest aberrations were for peak areas for ethyl febuxostat. Ethyl febuxostat is a neutral impurity that interacts most with the inner capillary wall so its peaks have bad symmetry. Results suggest that the precision of the proposed method is satisfactory.

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

Thesis includes: 26 pages, 9 figures, 10 tables and 11 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Validation, micellar electrokinetic chromatography, febuxostat

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

Reviewers: **Miranda Sertić, Ph.D.** *Assistant Professor* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Petra Turčić, Ph.D.** *Assistant Professor* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Kristina Pavić, Ph.D.** *Assistant* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2018.