

Ante Pavlinović

**Stabilitetno-indikativna HPLC metoda za analizu
febuksostata i njegovih oksidativnih razgradnih
produkata**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad prijavljen je 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 prihvaćenom vodstvu, vrijednim savjetima, strpljenju, uvijek prisutnoj pomoći i vremenu posvećenom izradi ovog diplomskog rada. Duboke zahvale dajem svojim prijateljima i kolegama za njihovo razumijevanje i motivaciju tijekom cjelokupnog studiranja. Od srca zahvaljujem svojoj obitelji i bližnjima na bespriekornoj podršci i radosti koju unose u moj život te ovaj rad ujedno posvećujem njima.

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1 Patofiziologija gihta | 1 |
| 1.2 Klinička slika gihta..... | 1 |
| 1.3 Lijekovi u liječenju gihta..... | 2 |
| 1.3.1 Nesteroidni anti-inflamatorni lijekovi (NSAID) | 2 |
| 1.3.2 Glukokortikoidi | 3 |
| 1.3.3 Kolhicin | 4 |
| 1.3.4 Inhibitori interleukina IL-1 | 5 |
| 1.3.5 Urikozurici..... | 5 |
| 1.3.6 Alopurinol..... | 6 |
| 1.4 Febuksostat..... | 7 |
| 1.4.1 Kemijska struktura i metabolizam febeksostata..... | 7 |
| 1.4.2 Način primjene i doziranje febeksostata | 8 |
| 1.4.3 Nuspojave febeksostata | 9 |
| 1.5 Ispitivanje stabilnosti lijekova..... | 9 |
| 1.5.1 Kinetika razgradnje lijeka..... | 9 |
| 1.5.2 Ciljevi ispitivanja stabilnosti lijeka | 11 |
| 1.5.3 Vrste ispitivanja stabilnosti | 11 |
| 1.5.4 Uvjeti ispitivanja stabilnosti | 12 |
| 1.5.5 Testovi stabilnosti i kriteriji prihvatljivosti | 13 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME | 14 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 15 |
| 3.1 MATERIJALI | 15 |
| 3.1.1 Kemikalije, standardi (CRS) i plinovi | 15 |
| 3.1.2 Instrumenti..... | 16 |
| 3.1.3 Kemijski pribor i posude | 16 |
| 3.1.4 Računalni programi | 16 |

| | |
|---|----|
| 3.2 METODE | 17 |
| 3.2.1 Priprema mobilne faze za kromatografiju | 17 |
| 3.2.2 Priprema standardnih otopina febeksostata (CRS) | 17 |
| 3.2.3 Priprema uzoraka febeksostata iz farmaceutskog gotovog oblika | 17 |
| 3.2.4 Uvjeti ispitivanja stabilnosti i analize uzoraka | 18 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 19 |
| 4.1 Optimizacija gradijenta za istovremenu analizu onečišćenja febeksostata | 19 |
| 4.2 Stres razgradnja febeksostata- oksidacija vodikovim peroksidom | 24 |
| 4.2.1 Analiza razgradnih produkata nakon oksidacije febeksostata | 27 |
| 5. ZAKLJUČCI | 32 |
| 6. LITERATURA | 33 |
| 7. SAŽETAK / SUMMARY | 35 |
| 7.1 Sažetak | 35 |
| 7.2 Summary | 36 |
| 8. Temeljna dokumentacijska kartica / Basic documentation card | |

1. UVOD

Giht je patološko upalno stanje čija se prevalencija povećala zadnjih desetljeća, a ujedno je i najčešći oblik upalnog artritisa u muškoj populaciji. Epidemiološke studije ukazuju na nekoliko rizičnih faktora odgovornih za razvoj gihta kao što su: prehrana (s povećanim unosom animalnih purina, alkohola i fruktoze), komorbiditeti (pretilost, metabolički sindrom, kronična bubrežna bolest i hipertenzija) te lijekovi (diuretici, beta-blokatori, acetil-salicilna kiselina, ACE-inhibitori te blokatori receptora za angiotenzin (osim losartana). Također, osobe oboljele od gihta imaju veći rizik od razvoja kardiovaskularnih oboljenja te kronične bubrežne bolesti (Doherty i sur., 2016).

1.1. Patofiziologija gihta

Odlaganje kristala u zglobovima (i oko zglobova) može rezultirati razvojem akutnog i kroničnog upalnog artritisa. Giht nastaje odlaganjem kristala mononatrij-urata-monohidrata (MSUM) u sinovijalnim zglobovima (Innes, 2015). Ksantin oksidaza katalizira oksidaciju hipoksantina i ksantina do mokraćne kiseline. Biokemijski se karakterizira saturacijom urata u ekstracelularnoj tekućini, što se naziva hiperuricemija (Khanna i sur., 2012). Serumske ili plazmatske koncentracije urata (MSUM) u tom slučaju prelaze 6.8 mg/dL (~400 μmol/L), što je ujedno i približna granica topljivosti urata u plazmi (Becker, 2017).

Od upalnih medijatora najbrojniji su neutrofili (>90% u zahvaćenom području), a uz njih se mjere i povišene vrijednosti CRP kod akutnih napadaja (Innes, 2015).

1.2. Klinička slika gihta

Giht se može podijeliti na 4 stadija: asimptomatski depoziti u tkivima, akutni giht, interkrički periodi te kronični giht (Engel i sur., 2017).

Akutni giht se očituje putem jake boli u distalnom zglobu, a često i u gležnju, koljenu, laktu te dijelovima šake. Prisutno je crvenilo, oteknuće te iznimno mekana površina zahvaćenog tkiva. Simptomi akutnog napadaja su obično ograničeni na 5-14 dana (Innes, 2015).

Interkrički periodi su razdoblja između napadaja a karakterizira ih hiperuricemija koja može uzrokovati nakupljanje urata u tkivima. Ovi periodi postaju sve kraći uz pogoršanje bolesti (Engel i sur., 2017).

Kronični i rekurentni giht prate ponovljeni napadaji unutar 1 godine od zadnjeg akutnog događaja, a simptomi su: kronična bol i odlaganje MSUM u više zglobova, a ujedno i oštećenje istih. Učestalost napadaja se povećava kod kroničnih stanja. Također, može doći do stvaranja nakupina u obliku nodusa, tzv. urički tofi, a nastaju u kasnim fazama bolesti oko površina prstiju, podlaktica, laktova, Ahilovih tetiva i ušiju. Kronična hiperuricemija može dovesti do kompleksnijih stanja kao što su stvaranje bubrežnih kamenaca te pojave intersticijskog nefritisa upravo zbog odlaganja urata u bubregu. Bubrežne manifestacije bolesti najčešće su prisutne kod kroničnih uričkih nakupina, posebice u pacijenata na terapiji diureticima (Innes, 2015).

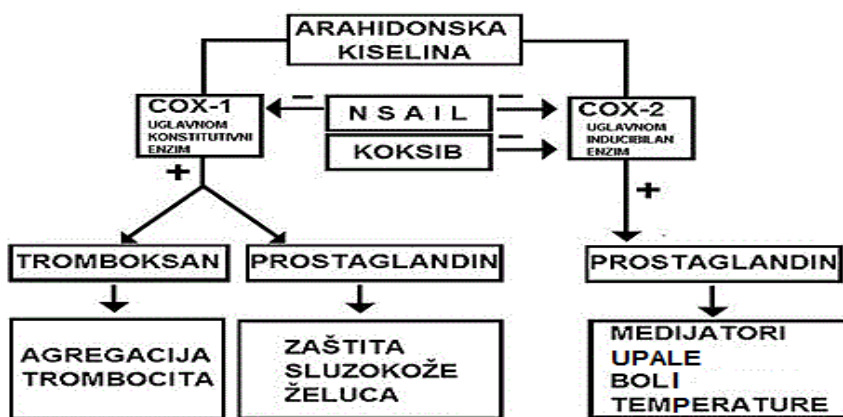
1.3 Lijekovi u liječenju gihta

Liječenje gihta može se podijeliti na akutno i kronično preventivno liječenje. Ciljevi liječenja su: tretirati akutno stanje, spriječiti buduće akutne napadaje te smanjiti količine urata u svrhu profilakse, ali i kako bi se spriječilo odlaganje kristala u tkivima.

Akutni napadaj gihta uključuje nekoliko terapijskih opcija, no valja napomenuti da nema pojedinog lijeka koji bi odgovarao liječenju svih pacijenata, uzimajući u obzir komorbiditete istih. Kako se radi o snažnom upalnom događaju, korišteni lijekovi su upravo anti-inflamatornog učinka. Najčešći terapijski izbor su nesteroidni antiinflamatorni lijekovi (NSAID), ali su također izbor i oralni glukokortikoidi te kolhicin. Isto tako, kod iznimno jakih upalnih napadaja primjenjuje se intraartikularna injekcija glukokortikoida (Becker, 2017).

1.3.1 Nesteroidni anti-inflamatorni lijekovi (NSAID)

Nesteroidni anti-inflamatorni lijekovi (NSAID) prvi su izbor u pogledu liječenja akutnih epizoda bolesti. Svoj učinak ispoljavaju blokiranjem sinteze prostaglandina, a pojedini lijekovi utječu na kemotaksiju upalnih medijatora, smanjenje produkcije interleukina-1 (IL-1), smanjenje produkcije slobodnih radikala i superoksida (Slika 1.). Sintezu prostaglandina blokiraju vezanjem za enzim ciklooksigenazu (COX), pa se stoga dijele na selektivne i neselektivne COX-inhibitore. Većina starijih lijekova ove skupine su neselektivni COX-inhibitori jer pokazuju sličan afinitet vezanja za COX-1 i COX-2 enzime, što je rezultiralo farmakološkim djelovanjem na više razina, ali i razvoju neželjenih učinaka pojedinih lijekova. COX-2 selektivni inhibitori su noviji pripadnici ove skupine te zbog svoje selektivnosti imaju užu spektralno djelovanje na razini stanične regulacije (primjerice, ne utječu na aktivaciju trombocita i imaju manje gastrointestinalnih nuspojava) (Katzung, 2015).



Slika 1. Mehanizam djelovanja NSAID

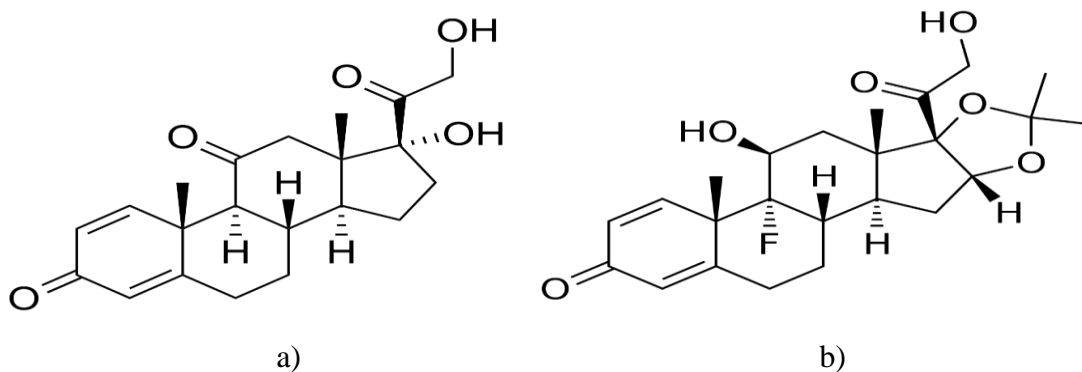
Izbor pojedinog lijeka uvelike ovisi o komorbiditetnim stanjima pacijenta, pa su stoga važne stroge kontraindikacije za primjenu NSAID: kronična bubrežna bolest (klirens kreatinina $< 60 \text{ mL/mL/1.73 m}^2$), aktivni duodenalni ili gastrički ulkus, srčano zatajenje ili neliječena hipertenzija, antikoagulativna terapija i postojeća alergija na neki od lijekova. Ovi lijekovi su najučinkovitiji ukoliko se primjene unutar 48 sati od pojave simptoma napadaja. Nova istraživanja pokazuju visoku učinkovitost primjene potentnih neselektivnih NSAID kao što su naproksen ili indometacin. Kao alternativa se mogu primjeniti selektivni COX-2 inhibitori, primjerice etorikoksib i celekoksib (Becker, 2018). Novije studije pokazuju bolju podnošljivost pacijenata na etorikoksib u odnosu na ostale NSAID (Zhang i sur., 2016). Uobičajeno trajanje terapije NSAID lijekovima je od 5 do 7 dana ovisno o početku pojave prvih simptoma napadaja, a terapija se prekida 1 ili 2 dana nakon povlačenja simptoma (Becker, 2018).

1.3.2 Glukokortikoidi

U slučaju vrlo teških napadaja gihta u terapiju se uvode glukokortikoidi (Slika 2.). Mehanizam protuupalnog djelovanja temelji se na povećanoj genskoj ekspresiji protuupalnih citokina te interakciji uz istovremenu inhibiciju transkripcijskih faktora odgovornih za ekspresiju pro-upalnih medijatora (Barnes, 1998).

Način primjene ovisi o nekoliko faktora kao što su broj zahvaćenih zglobova te komorbiditetna stanja pacijenta. Najčešći izbor je oralna primjena prednizona tijekom trajanja akutnih simptoma nakon čega se postupno smanjuje doza kroz 7 do 10 dana. Problem predstavljaju česte nuspojave: promjene raspoloženja, hiperglikemija, povišeni krvni tlak te retencija tekućine. Osim oralnih kortikosteroida, može se primjeniti intraartikularna injekcija

triamcinolon acetonida ukoliko je zahvaćen 1 ili 2 zgloba te ukoliko oralna primjena nije prikladna. Indirektni dokaz za intraartikularnu primjenu su brojni pozitivni učinci u liječenju reumatoidnog artritisa i osteoartritisa (Becker, 2018).

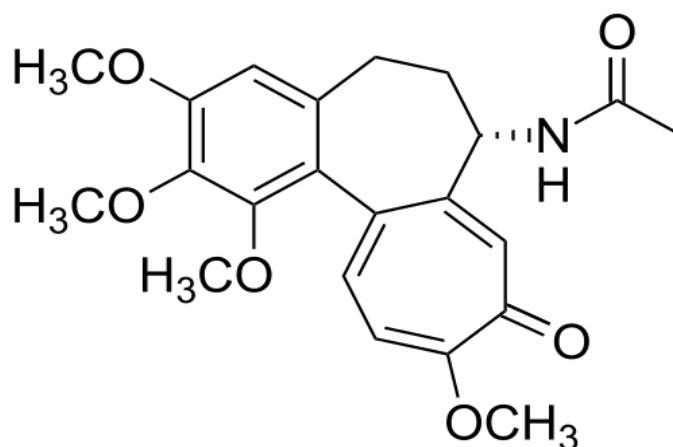


Slika 2. Kemijske strukture 2 najčešće korištena glukokortikoida u terapiji gihta:

a) prednizon i b) triamcinolon acetonid

1.3.3 Kolhicin

Kolhicin (Slika 3.) je alkaloid izoliran iz biljke *Colchicum autumnale*, ima vrlo dobru bioraspoloživost u organizmu te je svoju primjenu našao ne samo u liječenju već i u profilaksi gihta (Katzung, 2015). Glavni mehanizmi djelovanja temeljeni su na inhibitornom učinku na kemotaksiju neutrofila, adheziju i mobilizaciju, proizvodnju superoksida te smanjenje otpuštanja interleukina-1 (Leung i sur., 2015). Premda je bio primarna terapija godinama unazad, danas se kolhicin uvodi u terapiju tek u slučajevima kada pacijent ne podnosi NSAID i glukokortikoidnu terapiju, te ako je prethodni odgovor na liječenje gihta kolhicinom bio uspješan. U liječenju se koristi niska doza, a početak primjene je već kod prvih znakova akutnog napadaja (3 doze unutar prvih 24h). Terapija se postupno pekada 2 do 3 dana nakon nestanka simptoma. Kod pacijenata na profilaksoj terapiji kolhicinom u slučaju napdaja mogu se primjeniti više doze koje se također smanjuju po završetku akutnog stanja. Kontraindikacije za primjenu kolhicina uključuju pacijente s oštećenom funkcijom bubrega i jetre, kao i kod istovremenog korištenja potencijalnih inhibitora enzima CYP3A4 te P-glikoproteina (Becker, 2018).



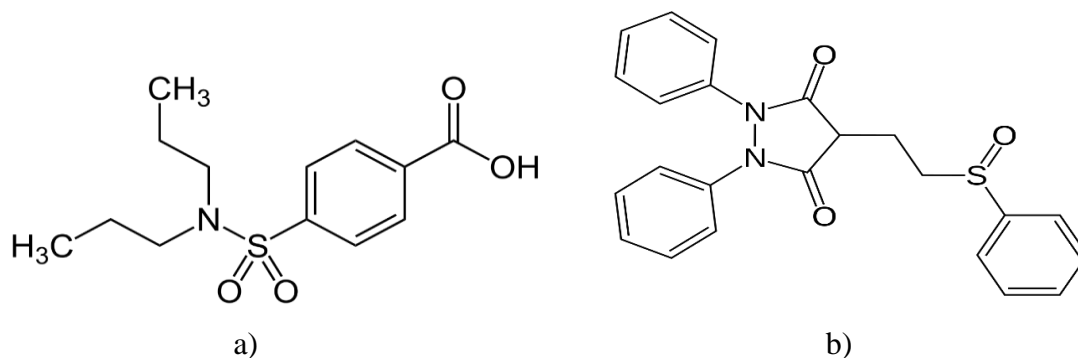
Slika 3. *Kemijska struktura kolhicina*

1.3.4 Inhibitori interleukina IL-1

Lijekovi koji ciljano inhibiraju put interleukina 1, kao što su anakinra, kanakinumab i rilonacept mogu se koristiti u liječenju akutnih stanja gihta. Iako još uvijek nema dovoljno podataka o njihovoj primjeni, učinkoviti su u slučajevima pacijenata refraktornih na terapiju nesteroidnim-protuupalnim lijekovima i glukokortikoidima. Nedavna istraživanja pokazuju visoku učinkovitost kanakinumaba u smanjenju boli nakon subkutane primjene. Kao i ostala terapija, učinkovitost terapije povećava se ukoliko se primjenjuju mjere prevencije napadaja snižavanjem razine urata u organizmu (Katzung, 2015).

1.3.5 Urikozurici

Probenecid i sulfinpirazon (Slika 4.) su lijekovi koji djeluju na principu izlučivanja urata iz organizma i stoga ih nazivamo urikozuricima. Indicirani su za pacijente sa slabim izlučivanjem urata iz organizma, ali i u slučajevima kada terapija alopurinolom i febuksostatom nije dovoljno učinkovita (Katzung, 2015). Mehanizam djelovanja temelji se na blokiranju bubrežnog aktivnog transporta urata u proksimalnim tubulima. Kompetitivno se natječu s uratom za URAT-1 transporter (urat-anionski izmjenjivač) te tako inhibiraju njegovu reapsorpciju. Početak liječenja je barem 2 do 3 tjedna nakon zadnjeg akutnog napadaja gihta. Najčešće nuspojave predstavljaju gastrointestinalne smetnje, ali i mogući osip kod nekih pacijenata. Oprez je potreban kod unosa tekućine i količine urina zbog potencijalnog nastanka bubrežnih kamenaca (Katzung, 2015).



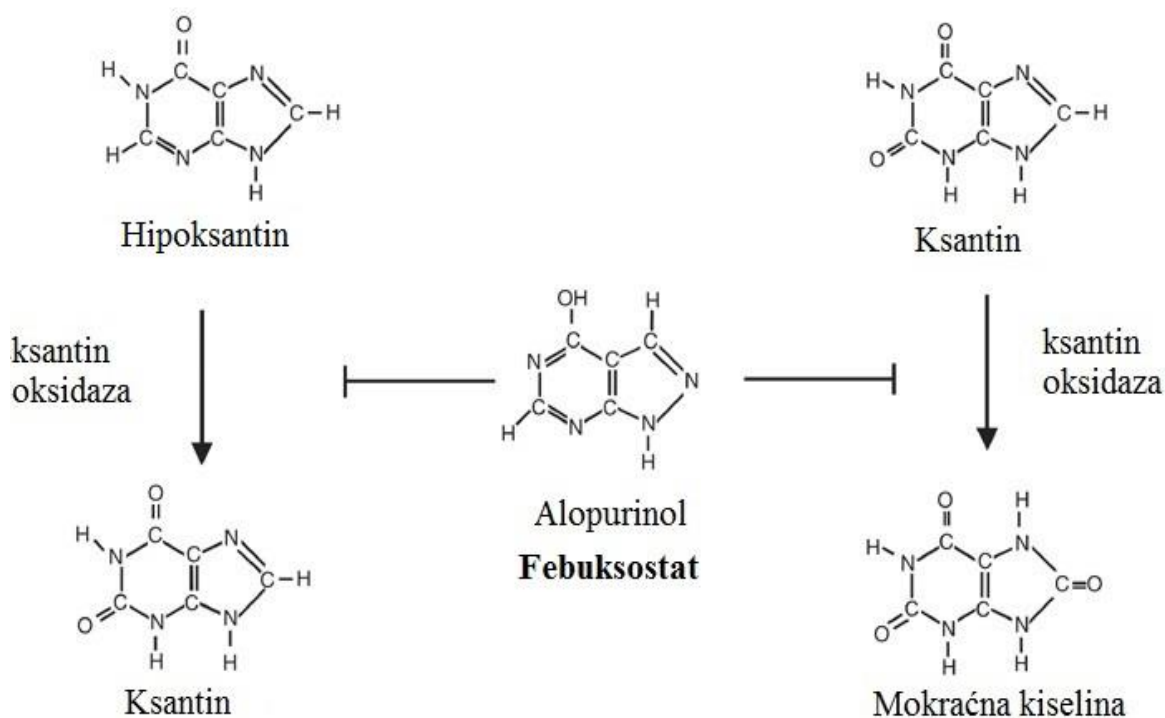
Slika 4. *Kemijske strukture: a) probenecida i b) sulfipirazona*

1.3.6 Alopurinol

Temeljni lijek za snižavanje urata u organizmu i liječenje u periodu između akutnih epizoda gihta je alopurinol. Koristi se kao prva linija liječenja kroničnog gihta a samo trajanje liječenja može biti i doživotno. Prilikom uvođenja alopurinola potrebno je održati liječenje kolhicinom ili protuupalnim lijekovima sve dok se ne postignu željene razine urata, nakon čega se nastavlja liječenje samo alopurinolom (Katzung, 2015).

Mehanizam djelovanja je inhibicija enzima ksantin oksidaze koja je odgovorna za konverziju hipoksantina i ksantina do mokraćne kiseline/urata (Slika 5.). Alopurinol je strukturni izomer hipoksantina te upravo zbog kemijske sličnosti podliježe metabolizmu putem ksantin oksidaze, uslijed čega vrši inhibiciju enzima u zadnjem koraku metabolizma (Gustaffson i Unwin, 2013). Enzimskom reakcijom nastaje aloksantin, a razina urata u organizmu se smanjuje.

Nuspojave koje se mogu javiti su: gastrointestinalne smetnje, periferni neuritis, vaskulitis, katarakta, hepatotoksičnost, intersticijski nefritis te makulopapularne lezije (Katzung, 2015). Također, neke studije pokazuju veću vjerojatnost razvoja hipertenzije, hiperkolesterolemije te sniženih vrijednosti jetrenih aminotransferaza (AST, ALT) kod terapije alopurinolom (Ryu i sur., 2013).



Slika 5. *Mehanizam djelovanja alopurinola i febuksostata*

Preuzeto i prilagođeno (<https://www.nature.com/articles/2402847/figures/3>)

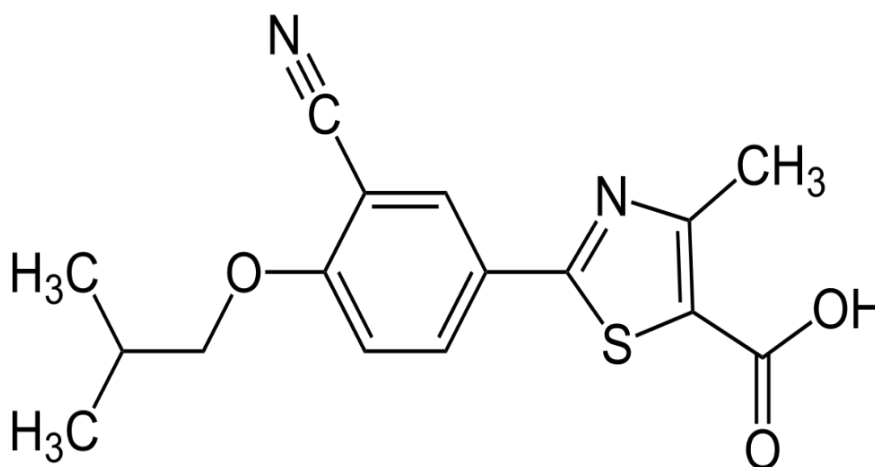
1.4 Febuksostat

Ne-purinski inhibitor enzima ksantin oksidaze odobren 2009. godine od strane FDA (*Food and Drug Administration*) u cilju poboljšanja i unaprjeđenja terapije gihta, svoje mjesto na tržištu pronalazi pod međunarodnim nezaštićenim nazivom febuksostat. Radi se o potentnom selektivnom inhibitoru koji efikasno smanjuje razine urata u organizmu, pritom ne interferirajući s ostalim enzimima u navedenom metaboličkom putu, što je iznimno važan napredak u odnosu na alopurinol. Febuksostat pokazuje učinkovitije sniženje urata od alopurinola što daje prednost zbog smanjenja terapijskih doza (Katzung, 2015).

1.4.1 Kemijska struktura i metabolizam febuksostata

Prema Međunarodnoj Uniji za Čistu i Primijenjenu kemiju (IUPAC) službeni naziv febuksostata je 2-(3-cijano-4-izobutoksifenil)-4-metil- 1,3-tiazol-5-karboksilna kiselina (Slika 6.) . Pripada skupini organskih molekula poznatih kao tiazolkarboksilne kiseline i derivati.

Heterociklička struktura sadrži tiazolni prsten koji ima vezanu karboksilnu skupinu (PubChem, 2005).



Slika 6. *Kemijska struktura febuksostata*

Febuksostat se dijelom metabolizira enzimima uridin difosfat glukuronidazama (UGT) primjerice UGT1A1, UGT1A3, UGT1A9, i UGT2B7, ali također i putem citokroma P450 (CYP) kao što su CYP1A2, CYP2C8 i CYP2C9 te nekim ostalim enzimima izvan CYP porodice. Oksidacija postraničnog izobutilnog lanca dovodi do farmakološki aktivnih hidroksilnih metabolita, koji su prisutni u znatno manjoj koncentraciji u plazmi od samog febuksostata. In vivo metaboliti acil glukuronidi te oksidativni metaboliti su najvećim dijelom prisutni u fecesu i urinu (Drug Bank, 2007).

1.4.2 Način primjene i doziranje febuksostata

Apsorbira se 80% doze nakon oralne primjene te vršne koncentracije u plazmi postiže nakon 1 sata. Metabolizira se u jetri oksidacijom i glukuronidacijom, vrijeme polueliminacije iznosi 4 do 18 sati.. Radi navedenih farmakokinetičkih parametara, terapijsko doziranje je jednom dnevno, a početna doza je 40mg. Zbog mogućih kardiovaskularnih nuspojava (iako nisu potvrđene) FDA nije odobrila doze više od 80 mg te je isključena prilagodba doza kod pacijenata sa oštećenom funkcijom bubrega (Katzung, 2015). Studije pokazuju značajno smanjenje razine urata u pacijenata koji koriste febuksostat, a refraktorni su na prethodnu terapiju alopurinolom te ujedno smanjuje progresiju kronične bubrežne bolesti (Sakai i sur., 2014).

1.4.3 Nuspojave febeksostata

Najčešći dosadašnji neželjeni učinci koji su zabilježeni su poremećaji funkcije jetre, upravo zbog svog ekstenzivnog metabolizma. Također se mogu javiti dijareja, glavobolja i nelagoda u trbuhu (EMA, 2012). Važno je napomenuti da pacijenti intolerantni na terapiju alopurinolom ne pokazuju smetnje kod terapije febeksostatom (Katzung, 2015).

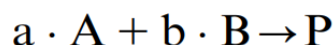
1.5 Ispitivanje stabilnosti lijekova

Stabilnost lijekova i farmaceutskih proizvoda označava kapacitet postojanosti osobina ljevkovite tvari i formulacije kao što su identitet, čistoća i potentnost, kroz određeni vremenski period. Stabilnost lijeka možemo podijeliti na nekoliko razina, pa tako razlikujemo kemijsku, fizičku i mikrobiološku stabilnost.

Sastav formulacije također može znatno utjecati na stabilnost i mehanizam razgradnje pripravka. Lijekovi se općenito učestalije razgrađuju u tekućim formulacijama, pogotovo u vodenom mediju, u odnosu na čvrste i ne-vodne ljevkovite oblike. Ispitivanja stabilnosti daju uvid na koji način se mijenja kvaliteta gotovog proizvoda, ljevkovite tvari ili pomoćne tvari kroz vrijeme pod utjecajem okolišnih čimbenika kao što su temperatura, vlažnost, svjetlost, pH te brojni ostali uvjeti koji mogu narušiti navedene dijelove formulacije (Ahuja i Dong, 2005). Osim razgradnje aktivne farmaceutske tvari (eng. *Active Pharmaceutical Ingredient*, API), ispitivanja stabilnosti često uključuju praćenje novonastalih produkata razgradnje, promjene topljivosti i raspadljivosti, oštećenje integriteta pakiranja te mikrobiološke kontaminacije (Loftsson, 2014).

1.5.1 Kinetika razgradnje lijeka

Brzina kemijske reakcije definira se kao promjena koncentracije reaktanta ili produkta kroz vremenski tijek reakcije.



gdje „a“ i „b“ predstavljaju broj molekula „A“ i „B“, a „P“ označava produkt reakcije. Stoga je brzina reakcije izražena kao $-d[A]/dt$, odnosno $-d[B]/dt$.

Reakcije nultog reda su reakcije koje ne uzimaju u obzir koncentraciju reaktanta:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k_0$$

Pri čemu je k_0 konstanta brzine reakcije nultog reda. Reakcije prvog reda uzimaju u obzir koncentraciju reaktanta, pa iz toga proizlazi da je brzina reakcije direktno proporcionalna koncentraciji reaktanta:

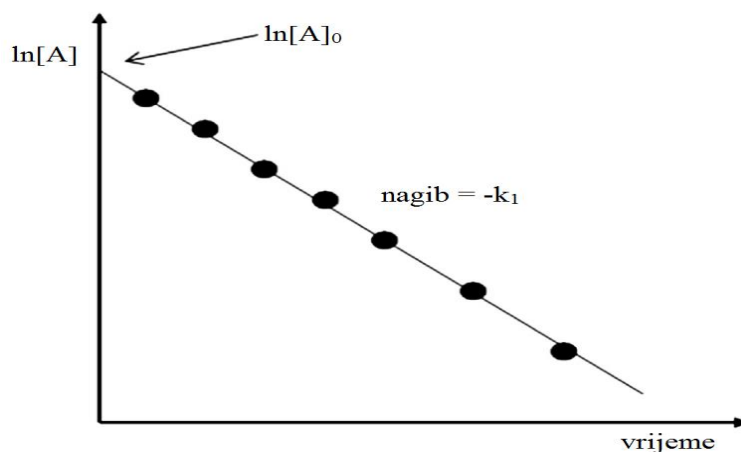
$$-\frac{d[A]}{dt} = k_1[A]$$

Iako su „prave“ reakcije nultog reda rijetke, tzv. reakcije pseudo-nultog reda su česte kod razgradnje ljekovitih tvari. U takvim uvjetima, lijek prati razgradnju reakcije prvog reda, ali je koncentracija tvari konstantna (ako govorimo o slučaju otapanja čvrste tvari u mediju):

$$-\frac{d[A]}{dt} = k_1[A] = k_0$$

Iz čega proizlazi da je koncentracija lijeka u određenom vremenu jednaka početnoj koncentraciji lijeka umanjenoj za umnožak konstante brzine reakcije nultog reda i vremena tijekom reakcije (Loftsson, 2014) :

$$[A] = [A]_0 - k_0 t$$



Slika 7. Krivulja ovisnosti negativnog logaritma koncentracije lijeka A u odnosu na vrijeme reakcije, u skladu s reakcijom 1. reda

Preuzeto i prilagođeno (Loftsson, 2014)

1.5.2 Ciljevi ispitivanja stabilnosti lijeka

Cilj ispitivanja stabilnosti je uspostaviti preporuke za uvjete čuvanja, odrediti period ponovnog testiranja i odrediti rok valjanosti lijeka.

Rok valjanosti (*eng. Shelf life*) je vrijeme kroz koje ljekoviti proizvod treba ostati intaktan, bez razgradnje sastavnica početne formulacije. Često se definira kao vrijeme razgradnje ljekovite tvari, a kriteriji prihvatljivosti iznose 95% ili 90% početne mase API-a. Osim kemijske razgradnje ljekovite tvari, granice se mogu postaviti u pogledu fizikalne stabilnosti pritom prateći promjenu kristalne forme lijeka, kao i izgled samog pripravka (Loftsson, 2014). Propisana je ICH smjernicama Q6A, Q6B i Q3A, a definirana kao testiranje onih svojstava koji su podložni promjeni tijekom skladištenja i čuvanja te mogu utjecati na: kvalitetu, sigurnost/toksičnost i efikasnost/djelovanje proizvoda (Cetina-Čižmek, 2003).

Rok trajanja (*eng. expiration date*) podrazumijeva datum do kojeg proizvođač jamči očuvanje kvalitete i potentnosti pripravka. Može biti definiran kao fiksni datum nakon proizvodnje lijeka, vrijeme nakon pripreme lijeka (npr. oralne miksture i otopine) i kao vrijeme od otvaranja spremnika u kojem se nalazi pripravak (npr. očne kapi). Iz toga proizlazi da rok valjanosti može označavati različit pojam od *Shelf-life* specifikacije (Loftsson, 2014).

1.5.3 Vrste ispitivanja stabilnosti

Ispitivanje stabilnosti gotovog proizvoda provodi se prema smjernicama *Europske Agencije za Lijekove (EMA)* ili neke druge ovlaštene organizacije (npr. *ICH, FDA*).

Tipovi stabilitetnih studija koje se provode su: ubrzani „stres“ test tijekom razvoja ljekovitog oblika, ispitivanje stabilnosti tijekom kliničkih pokusa, ispitivanja u svrhu registracije proizvoda te ispitivanja stabilnosti komercijalnih serija proizvoda. Sustav ispitivanja stabilnosti harmoniziran je na područjima Europe, SAD-a i Japana prema ICH vodiču Q1A (R2) te podrazumijeva način provođenja ispitivanja. (Ahuja i Dong, 2005). Zahtjeva se ispitivanje najmanje 3 serije supstancije i dvije od tri serije gotovog proizvoda izrađenog konačnim procesom i opremljenog u komercijalnu ambalažu (ICH, 2000).

1.5.4 Uvjeti ispitivanja stabilnosti

Općenito praćenje stabilnosti lijeka vrši se pri uvjetima različitih vrijednosti temperature i relativne vlažnosti. Postavljeni uvjeti određuju također i vremenski period trajanja ispitivanja, stoga razlikujemo dugoročno, ubrzano („stres uvjeti“) i među-uvjetno ispitivanje. Ovisno o vrsti pripravka i polaznim osobinama ljekovite tvari, određuje se frekvencija testiranja prema spomenutim vremenskim periodima (npr. 0, 3, 6 mjeseci za ubrzana ispitivanja; 0, 3, 6, 9 mjeseci za među-uvjet; svaka 3 mjeseca prve godine i svakih 6 mjeseci druge godine dugoročnog ispitivanja). Isto tako, često se koristi model sa četiri klimatske zone (Tablica 1.) koji daje približne uvjete čuvanja za različita područja svijeta, a pojedina zona uzima se za određenu regiju (Ahuja, 2001).

Tablica 1. *Prikaz 4 klimatske zone uvjeta čuvanja*

Preuzeto i prilagođeno (Ahuja, 2001)

| KLIMATSKA ZONA | OPIS/DEFINICIJA | UVJETI |
|----------------|---------------------------------|-----------------|
| I | umjerena klima | 21°C / 65% r.v. |
| II | subtropska i mediteranska klima | 25°C / 60% r.v. |
| III | vruća, suha klima | 30°C / 35% r.v. |
| IV | vruća, vlažna klima | 30°C / 70% r.v. |

„Stres“-ispitivanja podrazumijevaju povećane vrijednosti uvjeta razgradnje lijeka, pri čemu je trajanje ispitivanja kraće te dobiveni rezultati mogu ukazati na potencijalne promjene stabilnosti uslijed nepravilnog transporta i čuvanja lijekova. Svrhe ubrzanog ispitivanja lijekova su: utvrđivanje putova kemijske razgradnje lijeka, utvrđivanje uvjeta fizikalne promjene tvari-polimorfija i jednako važno ispitivanje kompatibilnosti unutar formulacije ili ambalaže ukoliko se radi o gotovom proizvodu (ICH, 2000).

1.5.5 Testovi stabilnosti i kriteriji prihvatljivosti

Lista testova koja se odnosi na ispitivanje stabilnosti lijeka često je slična samoj specifikaciji proizvoda, odnosno možemo ju smatrati njezinom podjedinicom. Testovi koji prate parametre promjene kao što su kvaliteta, identitet, čistoća i potentnost koriste se u ispitivanjima stabilnosti. Iz spomenutih parametara proizlaze ispitivanja izgleda, razgradnje, sadržaja i oslobađanja lijeka (Tablica 2.). Kriteriji prihvatljivosti predstavljaju granice vrijednosti rezultata pojedinih ispitivanja unutar kojih je lijek stabilan (Ahuja, 2001).

Tablica 2. *Prikaz testova stabilnosti i kriterija prihvatljivosti*

Preuzeto i prilagođeno (Ahuja, 2001)

| TEST | KRITERIJ PRIHVATLJIVOSTI |
|----------------------|--|
| Izgled | nema razlike u odnosu na kontrolni uzorak čuvan pri 5°C |
| Produkti razgradnje | ne više od 0.3% za pojedini produkt |
| Sadržaj | 90.0-110.0% |
| Oslobađanje/otapanje | Q = 80% u 45 min |

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Ispitivanje stabilnosti lijeka predstavlja jedan od ključnih koraka kako u razvoju, tako i u izlasku gotovog ljekovitog oblika na tržište. Novi suvremeni lijekovi su u velikom broju slučajeva vrlo osjetljive supstancije čija kemijska i fizikalna svojstva mogu biti narušena brojnim vanjskim (ali i unutarnjim) čimbenicima. U tu je svrhu potrebno razviti osjetljive i precizne metode ispitivanja, praćenja te identificiranja novonastalih produkata nestabilnosti. Odabirom prikladnih uvjeta ispitivanja cjelokupni proces razvoja i praćenja lijeka može se ubrzati i poboljšati što omogućuje dobivanje učinkovitije i kvalitetnije formulacije, kao i same aktivne ljekovite tvari.

Budući da se radi o novijem lijeku u kroničnoj terapiji gihta, praćenje uvjeta stabilnosti neophodno je u karakterizaciji febuksostata. Jedan od važnih testova stabilnosti je upravo razgradnja pri oksidativnim uvjetima koja može biti potencijalni problem u očuvanju kvalitete lijeka. Izlaganje lijeka oksidaciji i praćenje novonastalih promjena ključni je pokazatelj stabilnosti febuksostata, jer su lijekovi relativno često izloženi oksidativnoj okolini uslijed njihove primjene (otvaranje spremnika, uvjeti čuvanja, razgradnja i propusnost primarne ambalaže). Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta s masenim spektrometrom (LC/MS) najprikladnija je tehnika za praćenje i karakterizaciju nastalih razgradnih produkata unutar navedenih uvjeta ispitivanja stabilnosti febuksostata.

Prilikom ispitivanja lijeka potrebno je optimizirati korištenu analitičku metodu kako bi dobiveni rezultati bili uspješni i mjerodavni. Provođenjem analiza pri različitim gradijentima uz praćenje i detekciju eluiranih molekula dobivamo vrijedne podatke za optimalne uvjete analize tekućinske kromatografije. Pravilan izbor sastava mobilne faze od iznimne je važnosti kod istovremenog praćenja većeg broja spojeva.

Svrha ovog diplomskog rada je optimizirati uvjete kromatografske separacije febuksostata i njegova poznata 3 onečišćenja uz različite gradijente te ispitati oksidativnu stabilnost korištenjem ubrzanog „stress“ ispitivanja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije, standardi (CRS) i plinovi

Kemikalije :

- Adenuric[®]80 mg tablete (Berlin-Chemie Menarini Hrvatska)
- Dimetilsulfoksid (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Mravlja kiselina 98-100%, p.a. čistoće (Kemig, Zagreb, Hrvatska)
- Pročišćena voda pripremljena WaterPro sustavom za pročišćavanje vode (Labconco, Kansas City, SAD)
- Acetonitril za tekućinsku kromatografiju (Lach-ner, Neratovice, Češka)
- Vodikov peroksid (T.T.T. d.o.o., Sveta nedjelja, Hrvatska)

Standardi (CRS) :

- Febuksostat (2-(3-cijano-4-izobutoksifenil)-4-metil-1,3-tiazol-5-karboksilna kiselina) (Pliva Hrvatska, Zagreb, Hrvatska)
- Etil-febuksostat (etil 2-[3-cijano-4-izobutoksifenil]-4-metiltiazol-5-karboksilna kiselina) (Pliva Hrvatska, Zagreb, Hrvatska)
- Febuksostat amid (2-[3-karbamoil-4-izobutoksifenil]-4-metiltiamazol-5-karboksilna kiselina) (Pliva Hrvatska, Zagreb, Hrvatska)
- Febuksostat DEE (2-[3-(etoksikarbonil)-4-izobutoksifenil]-4-metiltiazol-5-karboksilna kiselina) (Pliva Hrvatska, Zagreb, Hrvatska)

Plinovi :

- Dušik > 99,999% vol (Peak Scientific, Renfrewshire, Velika Britanija)
- Helij 5.0 (Messer Group, Sulzbach, Njemačka)

3.1.2. Instrumenti

- Tekućinski kromatograf (Agilent 1100 Chromatograph, Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- LC/MSD Trap VL maseni detektor s elektrosprej-ionizatorom i analizatorom stupicom za ione (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

3.1.3 Kemijski pribor i posude

- Analitička vaga AG245 na četiri decimale (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Boce za mobilnu fazu sustava za tekućinsku kromatografiju
- Bočice za uzorkovanje 1,5 mL sustavom za tekućinsku kromatografiju (Agilent Technologies, SAD)
- Centrifugirka (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Filter za špricu (Chromafil Xtra 0,2 μm , 25 mm, Macherey-Nagel GmbH CoKG, Njemačka)
- Kolona za tekućinsku kromatografiju XBridge C18, dimenzija 150 mm x 4,6 mm, veličina čestica 3,5 μm (Waters, Milford, SAD)
- Mikropipeta Pipet-Lite XLS (Rainin, Oakland, SAD)
- Ultrazvučna kupelj (Elma, Singen, Njemačka)

3.1.4 Računalni programi

- ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
- LC/MSD Trap (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)

3.2 METODE

3.2.1 Priprema mobilne faze za kromatografiju

Mobilna faza pripravljena je miješanjem acetonitrila (ACN) čija čistoća odgovara kromatografskim zahtjevima, ultra-čiste vode (H₂O) dobivene pročišćavanjem WaterPro sustavom i mravlje kiseline (HCOOH) u postotnim udjelima redom 50:50:0.1.

3.2.2 Priprema standardnih otopina febeksostata (CRS)

Standardne otopine febeksostata, etil febeksostata i DEE-a pripravljene su otapanjem supstanci u acetonitrilu do koncentracija 0,5 mg/mL. Standardna otopina febeksostat amida pripravljena je otapanjem supstance u dimetilsulfoksidu (DMSO) da koncentracija bude 0,5 mg/mL.

Otopina febeksostata korištena kao poredbena otopina u sklopu ispitivanja stabilnosti pod oksidativnim „stress“ uvjetima pripravljena je otapanjem standarda febeksostata (CRS) u acetonitrilu (ACN) u odmjernoj tikvici od 5,0 mL do koncentracije 0.1 mg/mL.

Otopine febeksostata korištene kao radne standardne otopine pripravljene su iz navedenih standardnih otopina svakodnevno, pipetiranjem odgovarajućih volumena i otapanjem do željene radne koncentracije u mobilnoj fazi.

Ultrazvučna kupelj korištena je u svrhu potpunog otapanja čvrstih supstancija kako bi se dobile kromatografski potrebne bistre otopine. Standardne otopine febeksostata čuvane su na temperaturi +4°C u hladnjaku.

3.2.3 Priprema uzoraka febeksostata iz farmaceutskog gotovog oblika

Uzorci febeksostata dobiveni su pripremanjem otopine tableta *Adenuric*[®] 80 mg. Tablete su prethodno usitnjene te je izvagana masa koja odgovara količini febeksostata potrebnoj za izradu otopine. Masa je prebačena u tikvicu od 10,0 mL te nadopunjena acetonitrilom do oznake. Uzorak je vorteksiran na 2800 rpm 5 minuta, a zatim je za pospješenje ekstrakcije korištena ultrazvučna kupelj u trajanju od 30 minuta. Dobiveni supernatant odpipetiran je u Eppendorf epruvete nakon čega je centrifugiran pri 6000 rpm tijekom 5 minuta. Novodobiveni supernatant profiltriran je kroz Chromafil Xtra filter veličine pora 0,2 μm te je prebačen u novu odmjernu tikvicu. Koncentracija otopine uzorka korištene

za ispitivanja stabilnosti iznosila je 1 mg/mL. Otopina uzorka febeksostata čuvana je na +4°C u hladnjaku.

3.2.4 Uvjeti ispitivanja stabilnosti i analize uzoraka

Ispitivanje stabilnosti febeksostata „stress“ degradacijom izvršeno je korištenjem 3 % vodikovog peroksida (H₂O₂) u svrhu ubrzanja oksidativnih procesa te dobivanja potencijalnih novih produkata. Uzorci su čuvani na sobnoj temperaturi (20 °C) u trajanju od 140 min, omjer udjela 3 % otopine vodikovog peroksida i otopine uzorka febeksostata (1 mg/mL) bio je 1:1. Pripremljene su otopine uzoraka za analizu u mobilnoj fazi koje odgovaraju koncentraciji febeksostata 250 µg/mL.

Odjeljivanje sastojaka u radnim standardnim otopinama i analiza ispitivanog uzorka provedeni su na Agilent 1100 kromatografskom sustavu, na obrnuto-faznoj koloni Xbridge C18 (dimenzije 4,6 mm x 150 mm, veličina čestica 3,5 µm). Tijekom optimizacije kromatografske metode ispitivani su različiti gradijentni programi. Protok je bio 0.5 mL/min, a temperatura kolone postavljena je na 30°C. Kromatogrami su snimani na trima valnim duljinama: 237 nm, 254 nm i 320 nm detektorom diodnog niza (eng. *Diode array detector, DAD*).

Masena analiza provedena je na instrumentu Agilent 6300 Series ion Trap. Za ionizaciju analita korištena je elektrosprej ionizacija (ESI) dok je kao analizator korišten analizator stupica iona (eng. *Ion-trap*). Napon na kapilari iznosio je 3,5 kV. Za raspršivanje uzorka korišten je plin dušik, a tlak je raspršivanja iznosio 10 psi. Dušik je također služio za sušenje mobilne faze, protok plina za sušenje namješten je na 6 L/min, a temperatura na 325 °C. Maseni spektri snimani su u rasponu *m/z* 100-500.

HPLC sustav ispiran je prije analize svakog dana mobilnom fazom, a na kraju dana acetonitrilom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Optimizacija gradijenta za istovremenu analizu onečišćenja feboksostata

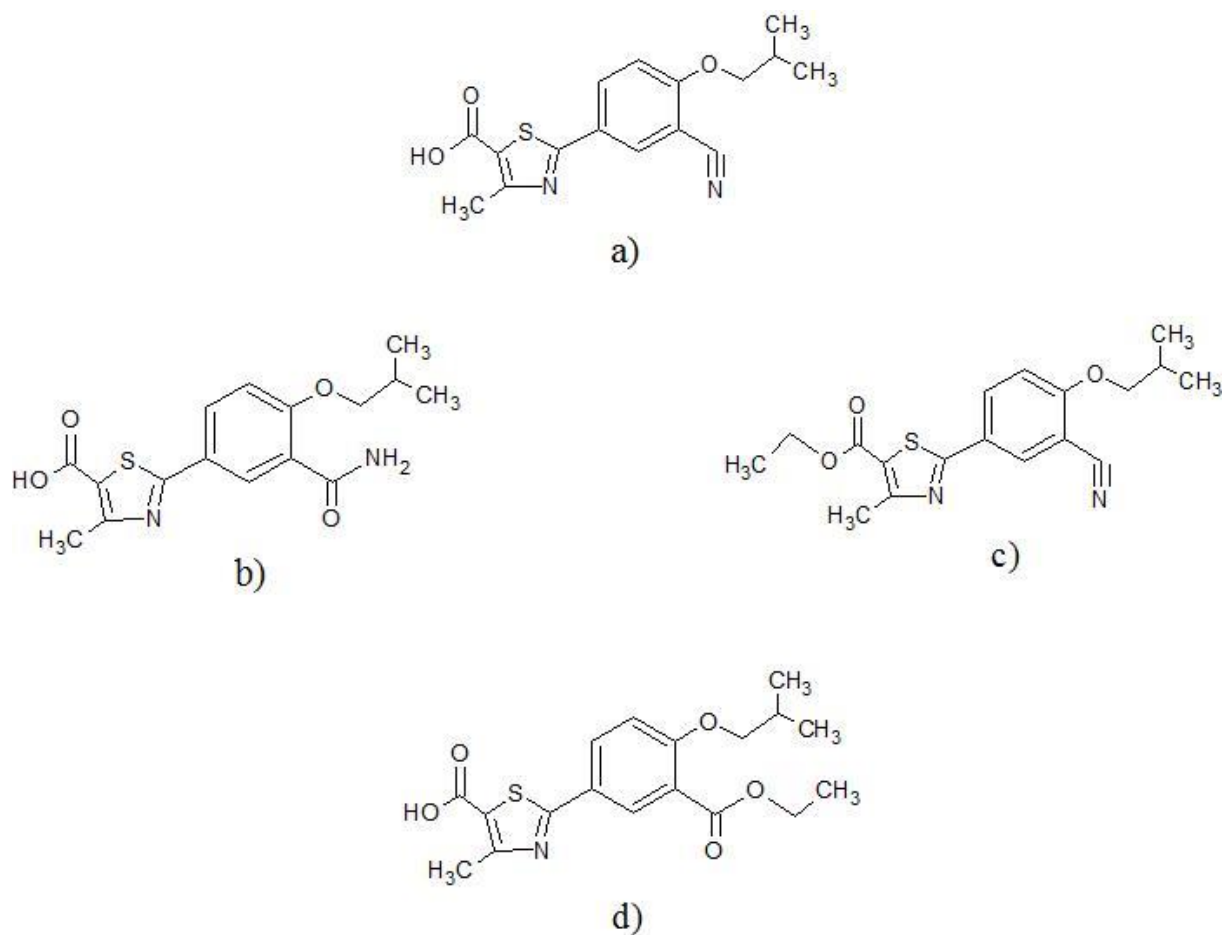
Analiza poznatih onečišćenja feboksostata iznimno je važan korak kod svakog novog ispitivanja, pogotovo ispitivanja stabilnosti. U tu svrhu potrebno je razviti optimalnu metodu za istovremenu analizu feboksostata i njegova 3 onečišćenja. Strukture analiziranih spojeva prikazane su na Slici 8.

Pripremljena je smjesa standarda feboksostata, feboksostat-amida, DEE-feboksostata i etil-feboksostata te su postavljeni početni gradijentni uvjeti analize na HPLC instrumentu.

Početni uvjeti uzeti za analizu bili su smjesa acetonitrila, vode i mravlje kiseline u omjeru 50:50:0.1, a valne duljine detekcije primjenom DAD detektora bile su 320 nm i 360 nm. Daljnjim analizama mijenjan je gradijent mobilne faze čiji su ciljevi bili :

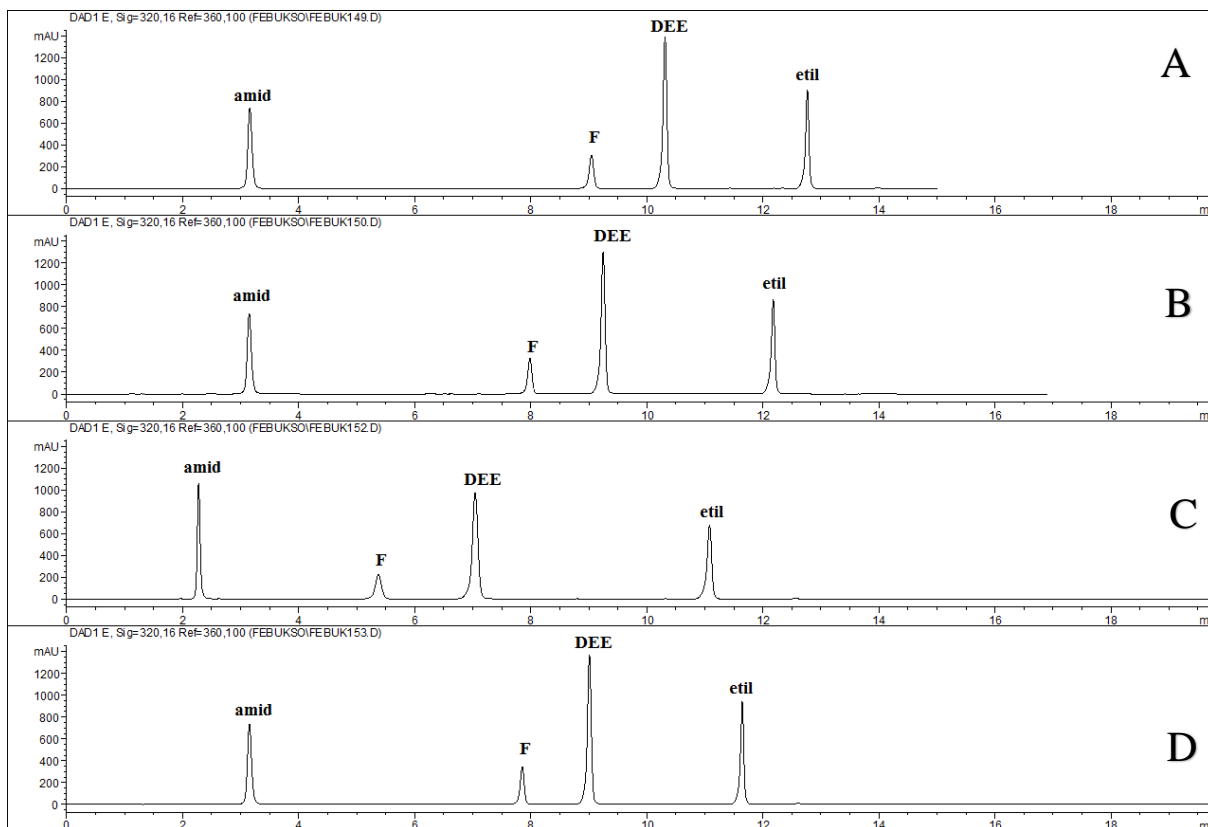
- Postići optimalno vrijeme trajanja analize
- Postići dobru razlučivost pikova svih analita
- Identificirati analite s obzirom na različita vremena zadržavanja pri različitim uvjetima analize
- Optimiziranu metodu aktivno primijeniti u svrhu budućih ispitivanja i analiza novih produkata/onečišćenja feboksostata dobivenih u postupku „stress“ razgradnje

Smjesa standardnih radnih otopina sadržavala je analite u koncentracijama od 50 µg/mL. Redoslijed elucije pojedinog analita ovisi o njegovom kemijskom afinitetu odnosno polarnosti pri čemu se može jače ili slabije vezati za nepolarnu C18 kolonu, tj. sporije ili brže eluirati iz kolone. Stoga zaključujemo da će promjena gradijenta odlučivati o vremenima zadržavanja analita i ukupnom trajanju analize. Zbog svoje kemijske strukture i polarnosti, feboksostat-amid najkraće se zadržava na koloni te predstavlja prvi eluirani pik, a slijede ga feboksostat, DEE-feboksostat i na kraju etil-feboksostat koji kao najmanje polaran spoj ostaje najdulje vezan za kolonu.



Slika 8. Prikaz struktura: a) febuksostata, b) febuksostat-amida, c) etil-febuksostata i d) DEE-febuksostata

Kromatograme tijekom optimizacije gradijenta za istovremenu analizu febuksostata i sva 3 onečišćenja prikazuje Slika 9. a pripadajuće gradijentne programe prikazuju sljedeće tablice 3. do 6.:



Slika 9. HPLC-DAD kromatogrami elucije febuksostata (F) i njegova 3 onečišćenja: febuksostat-amida (amid), DEE-febuksostata (DEE) i etil-febuksostata (etil) pri različitim gradijentima mobilne faze. Uvjeti analize: XBridge kolona C18, 4.6x150 mm, 3.5 μ m, temperatura kolone 30°C, brzina protoka 1 mL/min, valne duljine detekcije: 320 nm.

Tablica 3. Gradijent I (Slika 9., Kromatogram A)

| Vrijeme (min) | % B (H ₂ O) |
|---------------|------------------------|
| 0 | 50 |
| 5 | 50 |
| 10 | 10 |
| 15 | 50 |
| 17 | 50 |

Tablica 4. *Gradijent II (Slika 9., Kromatogram B)*

| Vrijeme (min) | % B (H ₂ O) |
|---------------|------------------------|
| 0 | 50 |
| 3 | 50 |
| 10 | 10 |
| 15 | 50 |
| 17 | 50 |

Uspoređujući kromatograme A i B na Slici 9., vidimo kako analiza, očekivano, brže završava kod ranijeg povećanja udjela acetonitrila (Kromatogram B). Isto tako, može se uočiti da se vrijeme elucije pikova u slučaju febuksostata i DEE-febuksostata najviše mijenjalo uslijed promjene udjela organske faze.

Tablica 5. *Gradijent III (Slika 9., Kromatogram C)*

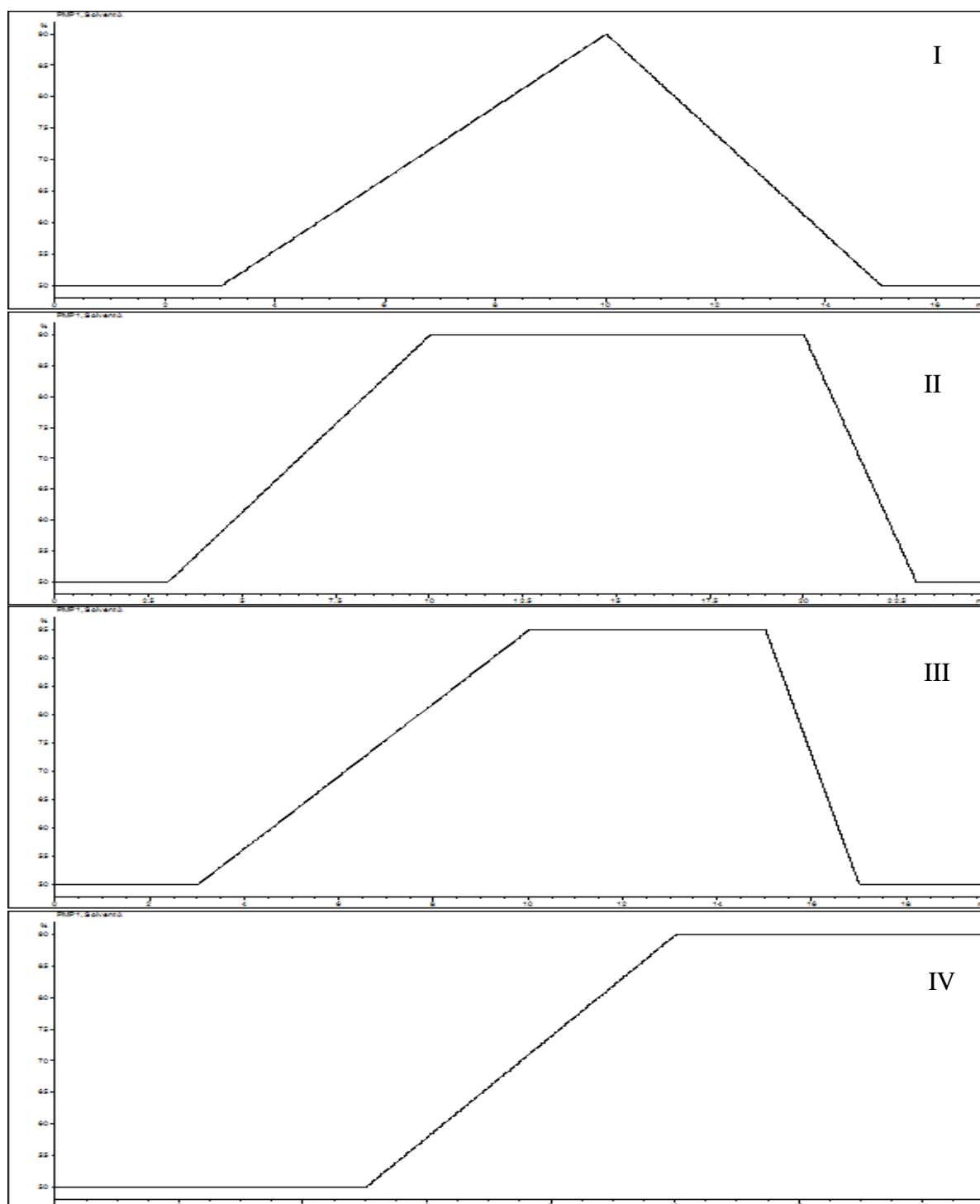
| Vrijeme (min) | % B (H ₂ O) |
|---------------|------------------------|
| 0 | 40 |
| 3 | 40 |
| 10 | 10 |
| 15 | 10 |
| 17 | 40 |
| 20 | 40 |

Kromatogram C (Slika 9.) prikazuje analizu pri najvećem udjelu acetonitrila u odnosu na ostale kromatograme. Početni udio acetonitrila od 60 % skraćuje trajanje analize te dolazi do primjetne razlike u brzini elucije analita. Ponovno se spomenuta razlika u vremenu elucije najbolje očituje za molekule febuksostata i DEE-febuksostata.

Tablica 6. *Gradijent IV (Slika 9., Kromatogram D)*

| Vrijeme (min) | % B (H ₂ O) |
|---------------|------------------------|
| 0 | 50 |
| 3 | 50 |
| 10 | 5 |
| 15 | 5 |
| 17 | 50 |
| 20 | 50 |

Usporedba gradijentnih programa za pojedine kromatograme prikazana je na Slici 10.



Slika 10. Usporedba promjene udjela (%) organske faze (acetonitril) tijekom gradijentne analize (min) za sva 4 gradijentna programa (I-IV).

Iako dakle očekivano vrijeme elucije analita ovisi o gradijentnom programu, odnosno o udjelu organskog otapala u mobilnoj fazi, važno je spomenuti da je razlučivanje između svih analita dobro.

Smanjenje udjela vodene faze, odnosno povećanje udjela organske faze u vremenu oko 10. minute (očekivani interval elucije feboksostata) omogućuje bolji uvid u varijaciju vremena elucije feboksostata pri različitim gradijentima, što se ujedno vidi u većim promjenama vremena zadržavanja.

Zaključno, u daljnjim analizama odabran je gradijentni program II. Nakon što se optimiziraju uvjeti stres razgradnje, potrebno je ispitati selektivnost metode, odnosno osigurati da su svi nastali produkti razgradnje razdvojeni.

4.2 Stres razgradnja feboksostata- oksidacija vodikovim peroksidom

Ispitivanje oksidativnog puta razgradnje feboksostata predstavlja važan dio stabilitetnih testova te je nužno uspostaviti odgovarajuće „stress“ uvjete. Kako ICH daje smjernice na koji način provesti ova ispitivanja, ali ne i analitičke uvjete, potrebno je naravno optimizirati uvjete oksidativne razgradnje.

U ovom diplomskom radu ispitani su koncentracija vodikovog peroksida kao oksidativnog sredstva, omjer vodikovog peroksida i otopine lijeka, temperatura i vrijeme izloženosti oksidativnim uvjetima.

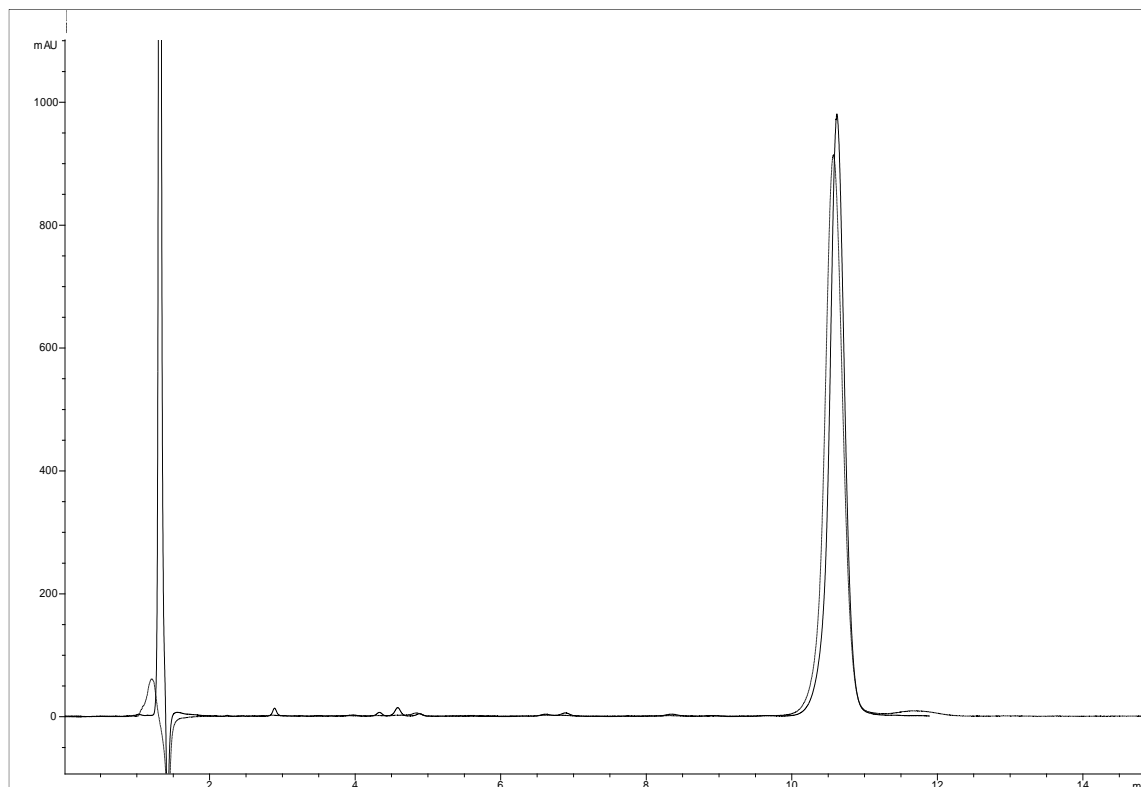
Niže koncentracije vodikovog peroksida (0,1-1,0 %) nisu rezultirale razgradnjom feboksostata, bez obzira na omjer (1:10 do 10:1) u kojem su pomiješani vodikov peroksid i otopina uzorka.

Kada je oksidativna razgradnja provedena 3% vodikovim peroksidom na 80°C u trajanju od 140 minuta, to je rezultiralo značajnom degradacijom feboksostata.

Sljedeći uvjeti oksidativne razgradnje bili su pri sobnoj temperaturi, uz dodatak 3% vodikovog peroksida u trajanju od 60 minuta, ali pritom nije zabilježena primjetna degradacija feboksostata.

Nakon detaljnog istraživanja i provedenih eksperimenata pronađeni su najprikladniji uvjeti oksidativne razgradnje korištenjem 3 % vodikovog peroksida na sobnoj temperaturi u trajanju od 140 minuta.

Otopina uzorka sadržavala je 3 % vodikov peroksid i otopinu febeksostata u omjeru 1:1. Oksidirani uzorak uspoređen je s intaktnom referentnom otopinom febeksostata pripremljenoj u jednakoj koncentraciji kao uzorak (250 ug/mL). Kromatogram na Slici 11. prikazuje kromatograme uspoređivanih otopina.



Slika 11. HPLC-DAD kromatogram eluiranih pikova uzorka oksidiranog febeksostata (---) i poredbene otopine febeksostata (—) (uvjeti razgradnje: 3% H_2O_2 u omjeru 1:1, 140 min, sobna temperatura)

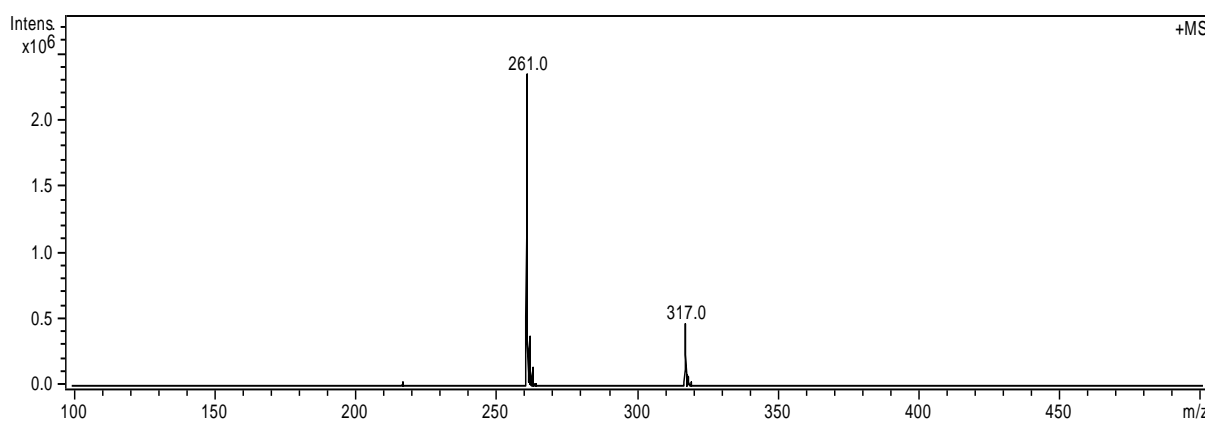
Podatci analiziranih otopina pokazuju da je došlo do oksidativne razgradnje što prikazuje Tablica 7.

Tablica 7. *Kromatografski podatci analize poredbene otopine i otopine oksidiranog uzorka febuksostata*

| | Vrijeme (min) | Površina pika |
|---------------------------------------|---------------|----------------|
| Poredbena otopina febuksostata | 10.579 | 16101.5 |
| Otopina oksidiranog uzorka | 10.620 | 14738.7 |

Smanjenje površine pika nakon oksidacije ukazuje na razgradnju febuksostata što otvara novo poglavlje ispitivanja novonastalih produkata. Za početak je potrebno analizirati pik razgrađenog febuksostata.

Masena spektrometrija daje najbolji uvid u promjene koje se događaju na molekulsko-kemijskoj razini kod nastajanja novih, nama nepoznatih spojeva te služi kao vrijedna metoda identifikacije. U masenom spektru oksidiranog pika febuksostata vidimo molekulski ion m/z 317 koji odgovara protoniranoj molekuli febuksostata ($M_r=316$) te fragmentni ion m/z 261. Kod fragmentnog iona m/z 261 uočen je gubitak mase od 56 Da koji odgovara odcjepljenju izobutilne skupine iz postraničnog eterskog lanca na benzenskom prstenu nakon čega ostaje hidroksilna skupina u navedenom dijelu molekule. Maseni spektar prikazan je na Slici 12.

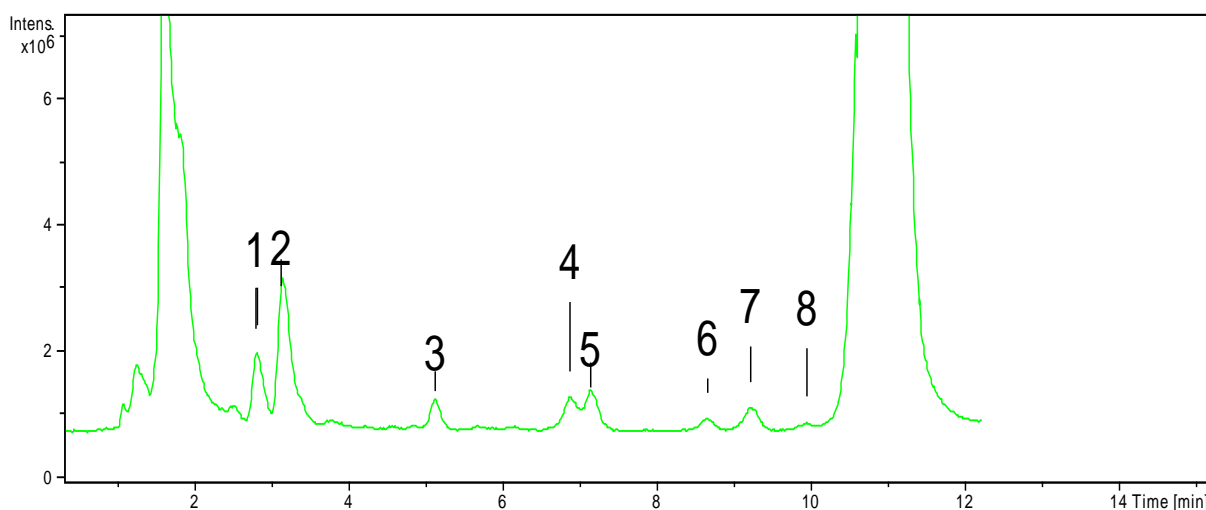


Slika 12. *ESI-MS maseni spektar febuksostata: molekulski ion m/z 317 i fragmentni ion m/z 261.*

4.2.1 Analiza razgradnih produkata nakon oksidacije febeksostata

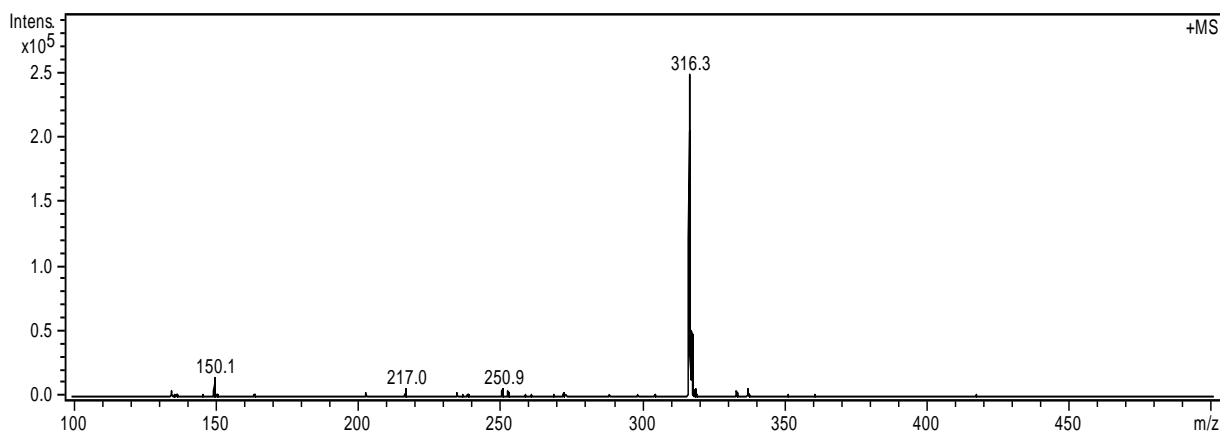
Kako bismo mogli analizirati novonastale produkte, bilo je potrebno povećati koncentraciju otopine uzorka febeksostata i time postići intenzivnije pikove razgradnih produkata s većom površinom. Stoga je pripravljena otopina uzorka febeksostata s koncentracijom od 1 mg/mL (4 puta veća koncentracija nego prije) te je podvrgnuta „stress“ razgradnji s 3% vodikovim peroksidom pri istim uvjetima (sobna temperatura, 140 minuta).

Eluirani pikovi analizirani su redom na masenom spektrometru (*MS-Total ion current chromatogram* (MS-TIC) način snimanja), a kromatogram analiziranog uzorka prikazan je na Slici 13.



Slika 13. MS-TIC kromatogram analiziranog uzorka oksidativne razgradnje febeksostata.

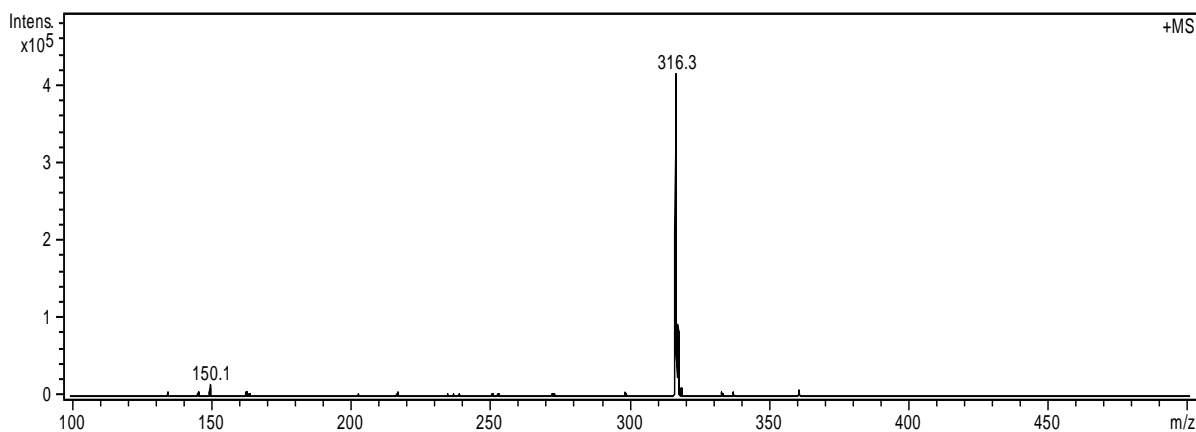
Maseni spektar 1. spoja prikazan je na Slici 14.



Slika 14. ESI-MS spektar 1. spoja

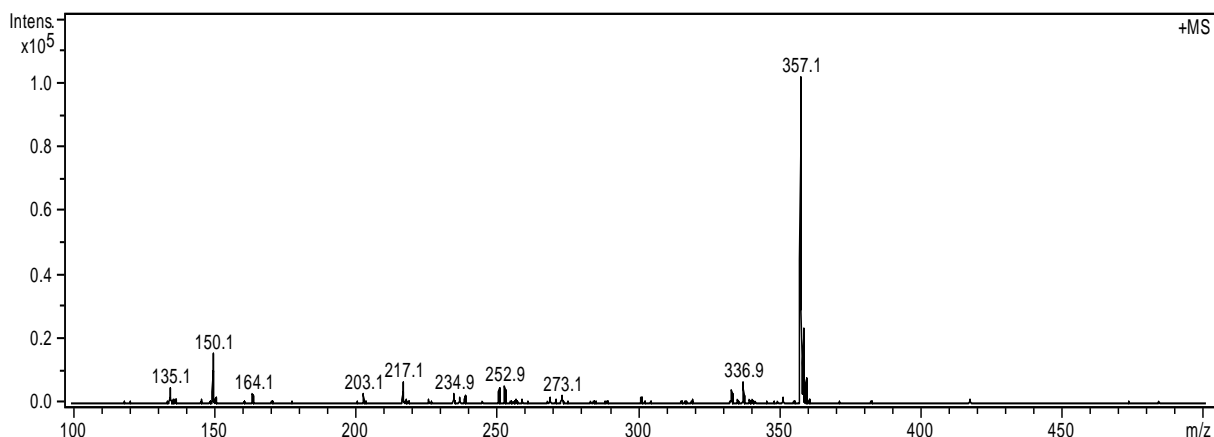
Na masenom spektru može se uočiti najdominantniji fragment m/z 316.3 te ostali fragmenti manjeg intenziteta: m/z 250.9, m/z 217.0, m/z 150.1.

Maseni spektar 2. spoja prikazan je na Slici 15.



Slika 15. ESI-MS spektar 2. spoja

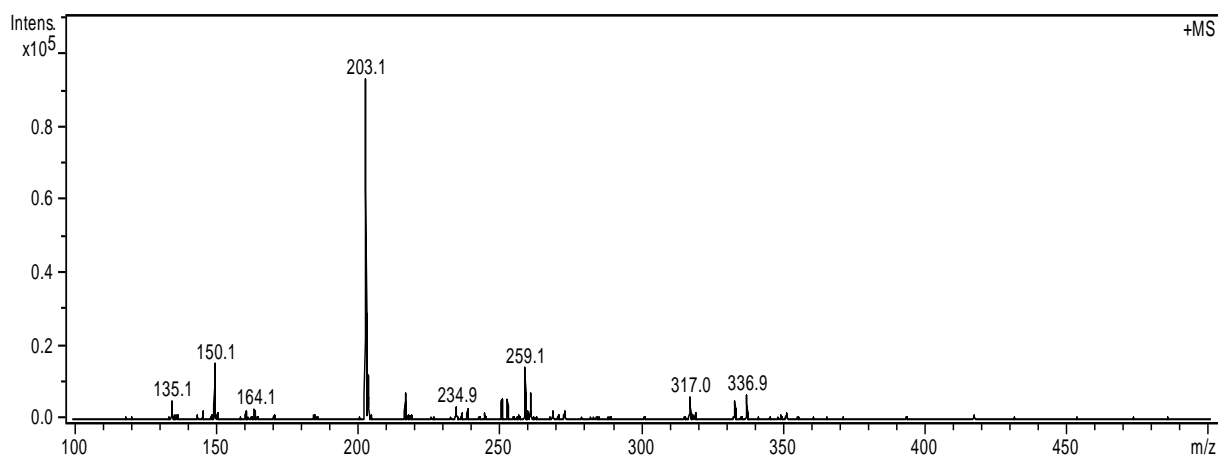
Maseni spektar 3. spoja prikazan je na Slici 16.



Slika 16. ESI-MS spektar 3. spoja

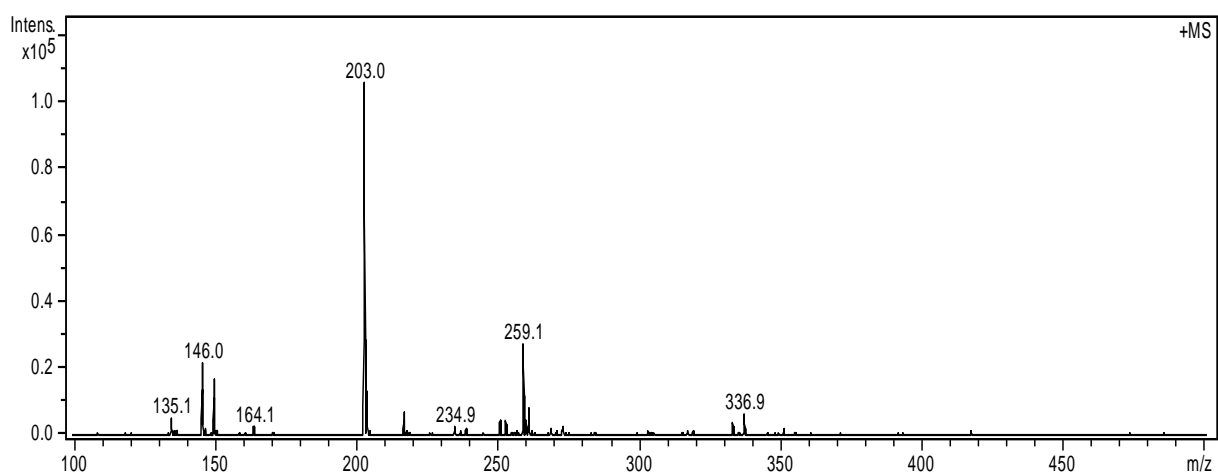
Najdominantniji fragment masenog spektra 3. spoja jest m/z 357.1, dok su ostali fragmenti manje izraženi. Može se pretpostaviti kako se radi o spoju veće molekulske mase od molekule febuksostata ($M_r=316$), ali i veće polarosti gledajući vrijeme elucije.

Maseni spektar 4.spoja prikazan je na Slici 17.



Slika 17. ESI-MS spektar 4. spoja

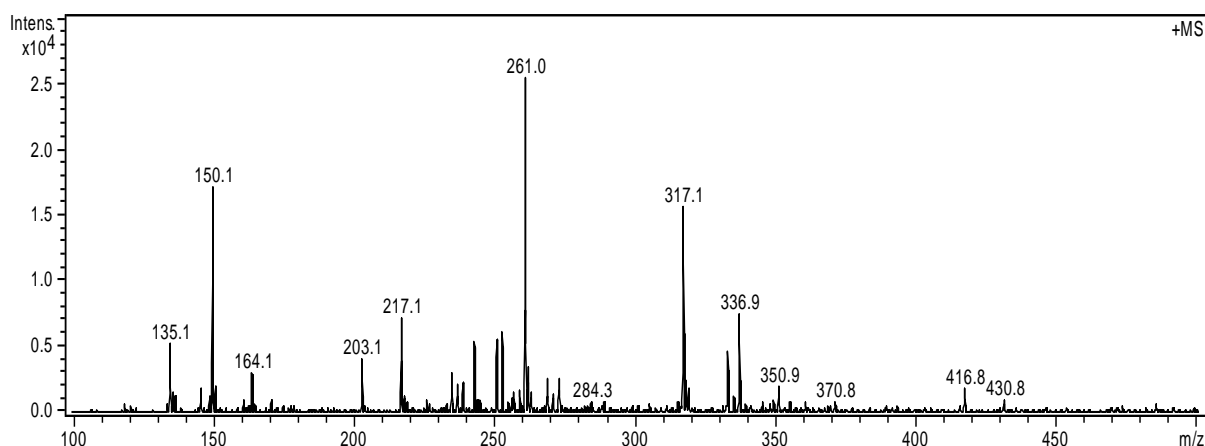
Maseni spektar 5.spoja prikazan je na Slici 18.



Slika 18. ESI-MS spektar 5. spoja

Promatrajući masene spektre 4. i 5.spoja, može se zaključiti kako pripadaju istim ili vrlo sličnim spojevima, a najdominantiji fragment je m/z 203. Sličnost vremena elucije dodatno ukazuje na njihovu strukturnu sličnost, odnosno moguće je kako se radi o potencijalnim dijasteromerima.

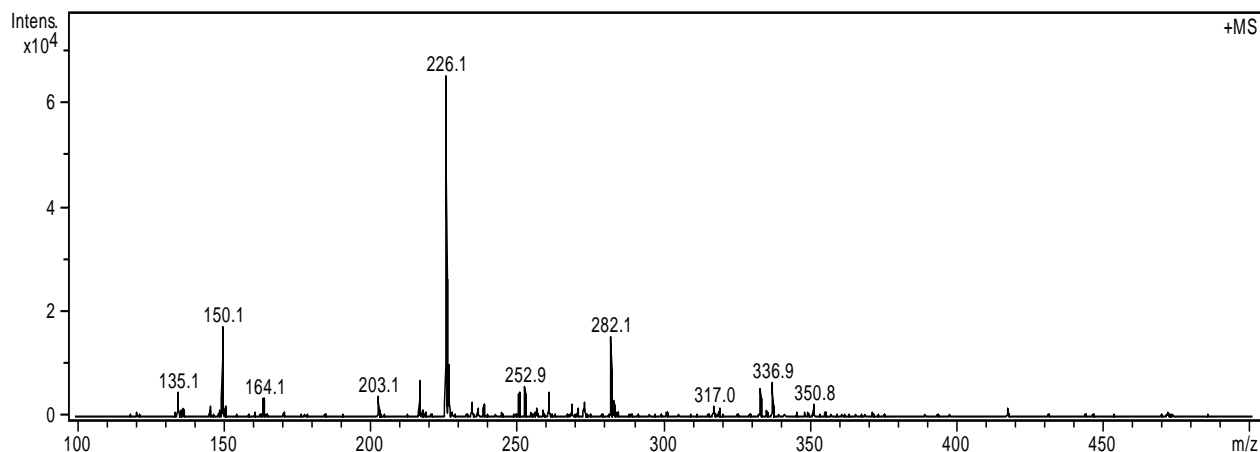
Maseni spektar 6.spoja prikazan je na Slici 19.



Slika 19. ESI-MS spektar 6. spoja

Na masenom spektru 6.spoja može se uočiti nekoliko izraženih fragmenata od kojih je najdominantniji m/z 261.0. Uspoređujući fragmente m/z 317.1 i m/z 261.0 vidi se razlika od 56 Da što upućuje na gubitak izobutilne (-CH₂CH₃ skupine. Također, razlika fragmenta m/z 217 u odnosu na spomenuti fragment m/z 261 odgovara odcjepljenju karboksilne skupine (-COOH) u iznosu od 44 Da.

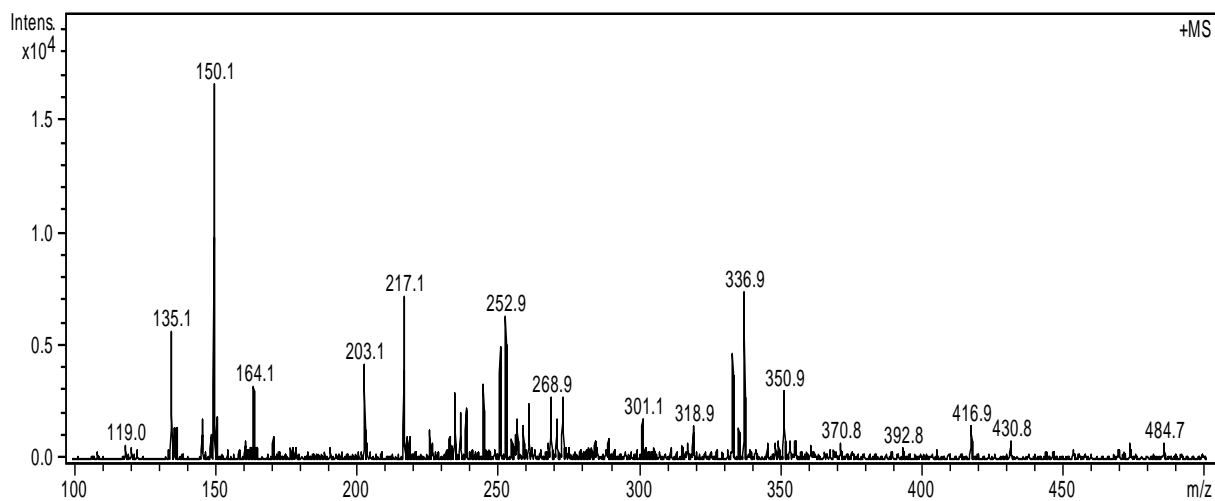
Maseni spektar 7.spoja prikazan je na Slici 20.



Slika 20. ESI-MS spektar 7. spoja

Najdominantniji fragment na masenom spektru 7.spoja je m/z 226.1, dok se od ostalih fragmenata ističu m/z 150.1 i m/z 282.1. Ponovno se može uočiti gubitak izobutilne skupine koji odgovara razlici između fragmenata m/z 282.1 i m/z 226.1.

Maseni spektar 8. spoja prikazan je na Slici 21.



Slika 21. ESI-MS spektar 8. Spoja

Na masenom spektru posljednjeg spoja vidimo brojne fragmente većih intenziteta među kojima se posebno ističe fragment m/z 150.1. Kako se radi o spoju koji eluira vrlo blizu same molekule febuksostata, može se pretpostaviti njihova strukturna sličnost, poglavito polarnost.

5. ZAKLJUČCI

Praćenje stabilnosti lijeka korištenjem ubrzanih uvjeta razgradnje uvelike može pomoći prilikom određivanja uvjeta čuvanja, ali i razvoja ljekovitog oblika. Jedna od najboljih metoda provođenja ovakvih ispitivanja jest upravo tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta sa masenom spektrometrijom (HPLC-MS). Oksidativni uvjeti stvoreni otopinom vodikovog peroksida (3 % H₂O₂) simuliraju uvijek prisutnu mogućnost razgradnje lijekova te skraćuju vrijeme trajanja klasičnih ispitivanja stabilnosti. Također, prije analize tekućinskom kromatografijom potrebno je pronaći optimalni sastav mobilne faze koji bi omogućio istovremeno praćenje febuksostata i njegovih onečišćenja te nastalih razgradnih produkata.

U ovom diplomskom radu:

1. Ispitani su različiti gradijentni programi za istovremenu HPLC-DAD-ESI-MS analizu febuksostata i njegovih onečišćenja. Optimalni uvjeti kromatografske analize su gradijentni program II (Tablica 4.), uz protok 0,5 mL/min i temperatura kolone na 30 °C. Kromatogrami su snimani na trima valnim duljinama: 237 nm, 254 nm i 320 nm detektorom diodnog niza.
2. Vremena zadržavanja febuksostata, febuksostat-amida, DEE-febuksostata i etil-febuksostata primjetno se mijenjaju uslijed manjih promjena gradijenta što ukazuje na važnost optimizacije uvjeta kromatografske separacije. To je posebice važno kod nastajanja novih razgradnih produkata nakon „stress“ razgradnje kada je potrebno osigurati potpuno razdvajanje svih nastalih razgradnih produkata, odnosno osigurati selektivnost primijenjene analitičke metode.
3. Optimizirani uvjeti oksidativne razgradnje febuksostata su: 3 % otopina vodikovog peroksida uz koncentraciju febuksostata u uzorku 250 µg/mL, kroz 140 minuta na sobnoj temperaturi (20 °C).
4. Prilikom razgradnje febuksostata uslijed oksidacije, došlo je do nastajanja osam razgradnih produkata. Njihove strukture moguće je okarakterizirati daljnjim istraživanjima primjenom vezanog sustava tekućinske kromatografije i masene spektrometrije.

6. LITERATURA

- Adenuric 80 mg filmom obložene tablete. Dodatak i sažetak opisa svojstava lijeka, 2012, <http://www.ema.europa.eu.>, pristupljeno 18.05.2018.
- Ahuja S, Dong W. Handbook Of Pharmaceutical Analysis by HPLC. San Diego, Elsevier, 2005, str. 342-343.
- Ahuja, S, Scypinski S. Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis. San Diego, Academic Press, 2001, str. 448-450.
- Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci*, 1998, 94, 557-72.
- Bajaj S, Singla D, Sakhuja N. Stability Testing of Pharmaceutical Products. *JAPS*, 2012, 2, 129-138.
- Becker MA. Treatment of Gout Flares, 2018, <https://www.uptodate.com/contents/treatment-of-gout-flares/print>, pristupljeno 05.03.2018.
- Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 13th edition, San Diego, McGraw-Hill Education, 2017, str. 705.
- Doherty M, Bijlsma H, Arden N, Dalbeth N, Hunter DJ. Oxford Textbook of Osteoarthritis and Crystal Arthropathy. Oxford, Oxford University Press, 2016, str 389.
- Engel B, Just J, Bleckwenn M, Weckbecker K. Treatment Options for Gout. *Deutsche Arzteblatt-International*, 2017, 114, 215-222.
- Febuxostat. Drug Bank, 2007, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB04854>, pristupljeno 14.03.2018.
- Febuxostat Compound Summary for CID 134018. PubChem, 2005, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Febuxostat#section=Names-and-Identifiers>, pristupljeno 13.03.2018.
- Gustafsson D, Unwin R. The pathophysiology of hyperuricaemia and its possible relationship to cardiovascular disease, morbidity and mortality. *BMC Nephrol*, 2013, 14, 164.
- ICH Topic Q 6 A Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances, 1999 https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q6A/Step4/Q6Astep4.pdf, pristupljeno 6.7.2018.

Innes JA. Ed Davidsons Essentials of Medicine, 2nd edition, Elsevier, Edinburgh, 2016, str. 574-576.

Katzung B. i Trevor A. Basic and Clinical Pharmacology 13th edition, McGraw Hill Education, San Francisco, 2015, str. 618-621, 635, 638.

Khanna D, FitzGerald JD, Khanna PP, Bae S, Singh M, Neogi T, Pillinger MH, Merrill J, Lee S, Prakash S, Kaldas M, Gogia M, Perez-Ruiz F, Taylor W, Liote F, Choi H, Singh JA, Dalbeth N, Kaplan S, Niyyar V, Jones D, Yarows SA, Roessler B, Kerr G, King C, Levy G, Furst DE, Lawrence Edwards N, Mandell B, Schumacher HR, Robbins M, Wenger M, Terkeltaub R American College of Rheumatology Guidelines for Management of Gout Part I: Systematic Non-pharmacologic and Pharmacologic Therapeutic Approaches to Hyperuricemia. *Arthritis Care Res*, 2012, 64, 1431–1446.

Leung YY, Yao Hui LL, Kraus VB, Colchicine-Update on mechanisms of action and therapeutic uses. *Semin Arthritis Rheu*, 2015, 45, 341-350.

Loftsson T. Drug Stability For Pharmaceutical Scientists, Academic Press, Oxford, 2014, str. 1-3, 5-8, 81.

Ryu HJ, Song R, Kim HW, Kim JH, Lee EY, Lee YJ, Song YW, Lee EB. Clinical risk factors for adverse events in allopurinol users. *J Clin Pharmacol.*, 2013, 53, 211-216.

Sakai Y, Otsuka T, Ohno D, Murasawa T, Sato N, Tsuruoka S. Febuxostat for treating allopurinol-resistant hyperuricemia in patients with chronic kidney disease. *Renal failure*, 2014, 36, 225-231.

Zhang S, Zhang Y, Liu P, Zhang W, Ma JL, Wang J. Efficacy and safety of etoricoxib compared with NSAIDs in acute gout: a systematic review and a meta-analysis., *Clin Rheumatol.*, 2016, 35, 151-158.

7. SAŽETAK / SUMMARY

7.1 Sažetak

Ispitivanje stabilnosti lijeka predstavlja jedan od ključnih koraka kako u razvoju, tako i u izlasku formulacije na tržište. Febuksostat je ne-purinski inhibitor enzima ksantin oksidaze odobren 2009. godine u cilju poboljšanja i unaprjeđenja terapije gihta.

Svrha ovog diplomskog rada je optimizirati uvjete kromatografske separacije febuksostata i njegova poznata tri onečišćenja korištenjem različitih gradijentnih programa te ispitati oksidativnu stabilnost korištenjem ubrzanog „stress“ ispitivanja s vodikovim peroksidom (H₂O₂), u cilju određivanja stabilnosti i uvjeta čuvanja febuksostata.

U radu su ispitani različiti gradijentni programi mobilne faze u tekućinskoj kromatografiji koji će omogućiti istovremeno praćenje febuksostata i tri njegova poznata onečišćenja, febuksostat amida, febuksostat DEE i etil-febuksostata, kao i potencijalne razgradne produkte. Kako bi se pronašli optimalni oksidacijski uvjeti koji će razgraditi febuksostat 5-20 %, ispitani su koncentracija vodikovog peroksida kao oksidativnog sredstva (0,1-3,0%), omjer vodikovog peroksida i otopine lijeka (1:10 do 10:1) te temperatura i vrijeme izloženosti oksidativnim uvjetima. Najbolji uvjeti oksidativne razgradnje febuksostata uključivali su 3% otopinu vodikovog peroksida, u omjeru 1:1, na sobnoj temperaturi u trajanju od 140 minuta. Pri ovim uvjetima febuksostat se razgradio na 91,5% početne koncentracije, a nastalo je ukupno 8 razgradnih produkata. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta s masenom spektrometrijom (LC/MS) najprikladnija je tehnika za praćenje i karakterizaciju nastalih razgradnih produkata. Cilj daljnjih istraživanja bit će okarakterizirati njihove strukture primjenom vezanog sustava tekućinske kromatografije i masene spektrometrije.

7.2 Summary

Drug stability study is one of the key steps of the formulation development, as well as its process of getting in the market. Febuksostat is a non-purine-selective xanthine oxidase inhibitor which was approved in 2009 with its main goal being an improvement of existing gout therapy. The purpose of this diploma thesis is gradient optimization for chromatographic separation of febuxostat and its three impurities to study the oxidative degradation using hydrogen peroxide (H_2O_2) „stress“ testing, while determining the stability of febuxostat. The different mobile phase gradient programs were tested in this thesis, to enable simultaneous monitoring of febuxostat, febuxostat-amide, febuxostat DEE and ethyl-febuxostat, so as potential degradation products. In order to find optimal oxidative conditions which will cause febuxostat degradation of 5-20 %, a hydrogen peroxide concentration, used as oxidation agent (0.1-3.0 %), a ratio of hydrogen peroxide and drug solution (1:10 to 10:1), temperature and time under oxidative conditions were examined. Best conditions for the oxidative degradation of febuxostat included 3 % hydrogen peroxide, in a ratio 1:1, at room temperature during 140 minutes. Under these conditions febuxostat has degraded to 91.5 % of his starting concentration, and there was formed a total of eight degradation products. High-pressure liquid chromatography combined with mass spectrometry (LC/MS) is the most suitable technique for monitoring and characterization in the stated conditions of febuxostat stability testing. The goal of future research will be structural characterization of the formed degradation product by using hyphenated LC-MS technique.

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

Stabilitetno-indikativna HPLC metoda za analizu febuksostata i njegovih oksidativnih razgradnih produkata

Ante Pavlinović

SAŽETAK

Ispitivanje stabilnosti lijeka predstavlja jedan od ključnih koraka kako u razvoju, tako i u izlasku formulacije na tržište. Febuksostat je ne-purinski inhibitor enzima ksantin oksidaze odobren 2009. godine u cilju poboljšanja i unaprjeđenja terapije gihta. Svrha ovog diplomskog rada je optimizirati uvjete kromatografske separacije febuksostata i njegova poznata tri onečišćenja korištenjem različitih gradijentnih programa te ispitati oksidativnu stabilnost korištenjem ubrzanog „stress“ ispitivanja s vodikovim peroksidom (H_2O_2), u cilju određivanja stabilnosti i uvjeta čuvanja febuksostata. U radu su ispitani različiti gradijentni programi mobilne faze u tekućinskoj kromatografiji koji će omogućiti istovremeno praćenje febuksostata i tri njegova poznata onečišćenja, febuksostat amid, febuksostat DEE i etil-febuksostat, kao i potencijalne razgradne produkte. Kako bi se pronašli optimalni oksidacijski uvjeti koji će razgraditi febuksostat 5-20 %, ispitani su koncentracija vodikovog peroksida kao oksidativnog sredstva (0,1-3,0 %), omjer vodikovog peroksida i otopine lijeka (1:10 do 10:1) te temperatura i vrijeme izloženosti oksidativnim uvjetima. Najbolji uvjeti oksidativne razgradnje febuksostata uključivali su 3% otopinu vodikovog peroksida, u omjeru 1:1, na sobnoj temperaturi u trajanju od 140 minuta. Pri ovim uvjetima febuksostat se razgradio na 91,5 % početne koncentracije, a formirano je ukupno 8 razgradnih produkata. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta s masenim spektrometrom (LC/MS) najprikladnija je tehnika za praćenje i karakterizaciju nastalih razgradnih produkata. Cilj daljnjih istraživanja bit će okarakterizirati njihove strukture primjenom vezanog sustava tekućinske kromatografije i masene spektrometrije.

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

Rad sadrži: 36 stranica, 21 grafička prikaza, 7 tablica i 21 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Ispitivanje stabilnosti lijeka, febuksostat, oksidativna razgradnja, optimizacija gradijenta, tekućinska kromatografija

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

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

Dr. sc. Daniela Amidžić Klarić, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Mario Jug, *izvanredni profesor 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

Stability indicating HPLC method for the analysis of febuxostat and its oxidative degradation products

Ante Pavlinović

SUMMARY

Drug stability study is one of the key steps of the formulation development, as well as its process of getting in the market. Febuxostat is a non-purine-selective xanthine oxidase inhibitor which was approved in 2009 with its main goal being an improvement of existing gout therapy. The purpose of this diploma thesis is gradient optimization for chromatographic separation of febuxostat and its three impurities to study the oxidative degradation using hydrogen peroxide (H₂O₂) „stress“ testing, while determining the stability of febuxostat. The different mobile phase gradient programs were tested in this thesis, to enable simultaneous monitoring of febuxostat, febuxostat-amide, febuxostat DEE and ethyl-febuxostat, so as potential degradation products. In order to find optimal oxidative conditions which will cause febuxostat degradation of 5-20 %, a hydrogen peroxide concentration, used as oxidation agent (0.1-3.0 %), a ratio of hydrogen peroxide and drug solution (1:10 to 10:1), temperature and time under oxidative conditions were examined. Best conditions for the oxidative degradation of febuxostat included 3 % hydrogen peroxide, in a ratio 1:1, at room temperature during 140 minutes. Under these conditions febuxostat has degraded to 91.5 % of his starting concentration, and there was formed a total of eight degradation products. High-pressure liquid chromatography combined with mass spectrometry (LC/MS) is the most suitable technique for monitoring and characterization in the stated conditions of febuxostat stability testing. The goal of future research will be structural characterization of the formed degradation product by using hyphenated LC-MS technique.

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

Thesis includes: 36 pages, 21 figures, 7 tables and 21 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Drug stability study, febuxostat, oxidative degradation, gradient optimization, liquid-chromatography

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
Daniela Amidžić Klarić, Ph.D. *Senior Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Mario Jug, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2018.