

## Determinarea impurităților și produșilor de degradare din produsele medicinale veterinare prin metode HPLC

### Determination of impurities and degradation products from veterinary medicinal products by HPLC method

Elena Gabriela Oltean

Sc Romvac Company SA

**Cuvinte cheie:** *impuritati, produși de degradare, HPLC, stabilitate*

**Key words:** *impurities, degradation products, HPLC, stability*

#### Rezumat

Impuritățile organice sau anorganice din produsul medicinal veterinar pot proveni din materiile prime, din procesul de fabricație, dintr-o purificare incompletă, dintr-o conservare necorespunzătoare. Limitele admise pentru impurități în cadrul preparatelor farmaceutice se apreciază prin comparare cu soluții etalon, conform monografiilor corespunzătoare. Studiile de degradare forțată definesc stabilitatea metodei de dozare a compușilor activi și a întregului produs finit în condiții excesive, de degradare accelerată. De asemenea furnizează informații privind căile de degradare și selectivitatea metodelor analitice aplicate. Informațiile furnizate de către studiile de degradare aplicate asupra compusului activ și produsului farmaceutic final trebuie să demonstreze specificitatea metodei analitice față de impurități. Studiile de degradare forțată trebuie să demonstreze că impuritățile și produșii de degradare rezultați nu interferează cu compusul activ. Metodele curente de degradare forțată se referă la hidroliza acidă, hidroliza bazică, oxidarea, expunerea la temperatura și lumina produsului medicinal. Metodele HPLC reprezintă un instrument analitic integral în analiza stabilității produsului medicinal. Metoda HPLC trebuie să poată separa, detecta și cuantifica diferiți produși specifici de degradare, care pot rezulta în urma preparării sau conservării produsului medicinal, precum și entitățile nou apărute în urma sintezei. Ghidurile FDA și ICH recomandă introducerea în documentația necesară punerii pe piață a produsului medicinal a rezultatelor, inclusiv cromatogramele specifice produsului medicinal supus degradării forțate. De asemenea, utilizarea metodelor HPLC în studiile de degradare forțată aplicate asupra produselor medicinale oferă informații importante asupra condițiilor de stabilire a formulei preparatului medicinal, de sinteză a acestuia, a modalităților de ambalare și a conservabilității acestora.

#### Abstract

The organic or inorganic impurities in the veterinary medicinal product can derive from starting materials, manufacturing process, incomplete purification, inappropriate storage. The acceptable levels of impurities in pharmaceuticals are estimated by comparison with standard solutions, according to the appropriate monographs. Forced degradation studies determine the stability of the method of dosage for the active compounds and for the entire finished product under excessive accelerated degradation conditions. They also provide information on degradation pathways and selectivity of analytical methods applied. The information provided by the degradation studies on the active compound and finished pharmaceutical product should demonstrate the specificity of the analytical method regarding impurities. Forced degradation studies should demonstrate that the impurities and degradation products generated do not interfere with the active compound. The current forced degradation methods consist of acid hydrolysis, basic hydrolysis, oxidation, exposure of the medicinal product to temperature and light. HPLC methods are an integral analytical instrument for the analysis of the medicinal product. The HPLC method should be able to separate, detect and quantify various specific degradation products that can appear after manufacture or storage of the medicinal product, as well as new elements appearing after synthesis. FDA and ICH guidelines recommend the enclosure of the results, including the chromatograms specific to the forced degradation-subjected medicinal product, in the documentation for marketing authorization. Using HPLC methods in forced degradation studies on medicinal products provides relevant information on the method of determination for the formulation of the medicinal product, synthesis product, packaging methods and storage.

## Introducere

Cromatografia de lichide de înaltă performanță HPLC reprezintă un instrument analitic important utilizat pentru studiul stabilității produselor medicinale [12, 13].

Metodele HPLC permit separarea compușilor individuali prezenți într-un amestec, identificarea și cuantificarea fiecărui component.

Cromatografia poate fi descrisă ca un proces de transfer de masa care implică adsorbția.

În metodele HPLC, datorită presiunii înalte de lucru, proba de analizat este trecută împreună cu faza mobilă printr-o coloana cromatografică umplută cu un sorbent – faza staționară, conducând la separarea compușilor din probă [12, 13].

Presiunea de lucru poate atinge 400 – 600 bari, permitând separarea compușilor în timp scurt, comparativ cu metodele clasice cromatografice, care se bazează pe separarea la presiune gravitațională.

Compusul activ din coloana cromatografică este un material granular format din particule de siliciu sau diferite tipuri de polimeri.

Componentii dintr-un amestec sunt separate pe baza gradelor diferite de interacțiune cu particulele fazei staționare.

Faza staționară este alcătuită dintr-un amestec de solvent (metanol, acetonitril, apă). În procesul de separare un rol important îl are temperatura de lucru, prin influența asupra interacțiunilor între compusul de analizat și faza staționară [1].

Aceste interacțiuni sunt: **fizice, de tip hidrofob, dipol – dipol, ionice**, sau combinații ale acestora. În alegerea fazei staționare și a fazei mobile se ține cont de structura chimică a compusului de analizat [1, 2].

Schema unui cromatograf de lichide de înaltă presiune cuprinde: **pompa, autosampler-ul, detectorul și compartimentul fazei mobile (solventilor)**. Cu ajutorul pompei proba de analizat este trecută prin coloana cromatografică, ajungând la detector [12].

Detectorul generează un semnal proporțional cu cantitatea de proba trecută prin coloana, permitând astfel analiza cantitativă.

Prelucrarea datelor este făcută cu ajutorul unui software specific fiecărui producător de echipamente HPLC.

Pompa poate lucra în gradient (în acest caz este posibilă modificarea fazei mobile și a fluxului de solvent la diferite intervale de timp, permitând separarea fină a compușilor unui amestec) sau liniar.

Detectorul poate fi de tip: **UV / VIS, diode array (PDA), detector de conductivitate, detector de fluorescență, detector de indice de refracție, detector electrochimic, spectrometru de masă**.

În funcție de structura chimică a compușilor de separat și de caracteristicile fazei staționare (coloana cromatografică) metodele cromatografice se disting metode cromatografice cu faza normală, cu faza inversă, de excludere moleculară, de schimb ionic, de bio-afinitate.

La trecerea prin coloana cromatografică compușii dintr-un amestec sunt reținuți la timpi diferiți – timp de retenție - în funcție de afinitatea acestora pentru coloana și de procesele de partiție realizate între faza staționară și faza mobilă.

Timpul de retenție este influențat de tipul de eluent (faza mobilă), compoziția fazei mobile, tipul de faza staționară, natura analitului.

Eficiența și selectivitatea fazei staționare sunt parametri intrinseci ai coloanei cromatografice, și depind de tipul de faza staționară, lungimea coloanei, diametrul particulelor fazei staționare, viteza de curgere prin coloana (fluxul), temperatura, prezența compușilor ionizabili.

Metodele HPLC utilizate în controlul produselor medicinale trebuie să poată furniza informații cu privire asupra identității, purității și stabilității pe perioada de conservare a compusului activ [2-4].

Metoda analitică trebuie să cuantifice riguros compusul activ, de interes, fără să

interfereze cu eventualele impurități prezente în materia primă sau cele rezultate în urma procesului de fabricație și nici cu produsii rezultați prin degradare forțată aplicată asupra produsului medicinal [1-5].

În cazul prezenței mai multor compuși activi în produsul medicinal, metoda HPLC trebuie dezvoltată astfel încât să permită separarea acestora – rezoluția metodei.

Metoda HPLC trebuie să furnizeze informații asupra purității peak-ului compusului activ de interes, ținând cont de influența fazei mobile și a solventului de extracție [12, 13].

### Studiile de degradare forțată

Conform documentelor ICH și FDA validarea unei metode HPLC furnizează informații asupra stabilității produsului medicinal analizat, procedura analitică având capacitatea de a detecta modificările dependente de timp ale proprietăților compusilor activi. O astfel de metodă poate cuantifica cu acuratețe compușii activi, fără interferența cu produșii de degradare, impuritățile intrinseci, excipienții sau alte impurități potențiale [7-11].

Aceste metode furnizează informații asupra modului de eliberare a compusului activ și a produsului medicinal, compatibilitatea excipienților, influența modului de ambalare. Studiile de degradare forțată aplicate asupra unui compus activ sau unui produs medicinal vor furniza, de asemenea, informații asupra căilor de degradare ale acestora, diferențierea între produșii de degradare datorăți compusului activ și cei rezultați din degradarea excipienților, elucidarea structurii produșilor de degradare, determinarea stabilității intrinseci a moleculei compusului activ în soluție și în formă solidă, mecanismele de degradare termică, hidrolitică, oxidativă și fotolitică ale substanței active și compusului medicinal [11].

Experimentele de degradare forțată sunt realizate astfel încât să se obțină

degradarea controlată a produsului medicinal, respectiv compușilor activi, pentru observarea modului de eluție în metoda HPLC.

Prin expunerea probelor la condiții extreme de tipul temperaturii, radiației luminoase, domeniului larg de pH și agenților oxidanți, se obțin compuși degradați parțial care pot fi analizați prin HPLC în scopul determinării interferențelor dintre peak-urile datorate compușilor activi și cele ale substanțelor înrudite [7-11].

Scopul este obținerea unei degradări de 10%; orice degradare suplimentară de până la 30% face subiectul unei degradări secundare, de aceea se recomandă conducerea experimentelor în acest domeniu (10%).

Documentele reglementarilor FDA și ICH furnizează definiții utile și comentarii generale asupra studiilor de degradare, însă informații puține cu privire la strategiile și principiile de bază pentru realizarea studiilor de degradare forțată (ex. în cazul medicamentelor slab solubile sau compușilor stabili)[3-9].

Degradarea excesivă a unei molecule poate conduce la profile de degradare care nu sunt reprezentative pentru condițiile de stocare și pentru devoltarea metodelor de preparare și analiză a produsului medicinal.

Astfel, studiile de degradare trebuie să nu fie excesive. Trebuie stabilit un echilibru între cantitatea de agent degradant și timpul de degradare, deoarece anumiți factori pot să nu conducă la o degradare semnificativă. Pentru fiecare tip de degradare se prepară câte o probă martor, pentru a discrimina între background și proba degradată [11].

Experimentele de degradare forțată se pot aplica și asupra compusului activ / excipienți pentru observarea căilor de degradare a substanței de interes.

De asemenea trebuie luate în calcul interacțiunile care pot apărea între compusul de interes și capsula / filmul protector.

Condițiile de degradare se ajustează în funcție de fiecare compus activ de interes,

deoarece apar diferențe de răspuns legate de solubilitate sau stabilitatea extremă la anumite condiții. Ducerea la extrem a condițiilor de degradare forțată poate conduce la rezultate inexacte,

neconcludente pentru studiile ulterioare de stabilitate și conservabilitate a produsului după expunerea de durată, semnificativă (Tabelele 1 și 2).

**Tabelul 1.**

Exemple de condiții de degradare forțată aplicate compusului activ și produsului medicinal

Substanța activă		Produs medicinal		
Solid	Soluție / Suspensie	Solid	Semisolid	Soluție/ Suspensie
Fotoliza Termoliza Temperatura Umiditate	Hidroliza acida/ bazica Oxidare	Fotoliza Oxidare Temperatura/ Umiditate	Fotoliza Oxidare Termoliza Temperatura/ Umiditate	Fotoliza Oxidare Termoliza

**Tabelul 2.**

Condiții generale de studii de degradare forțată

Tip de degradare	Condiții experimentale	Condiții de stocare
Hidroliza acida	HCl 0.1 N, HCl 0.5 N, HCl 1N	15, 60, 90 min.
Hidroliza bazica	NaOH 0.1 N, NaOH 0.5 N, NaOH 1 N	15, 60, 90 min.
Oxidare	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10%	15, 60, 90 min.
Termoliza	60°C, 80°C,	60, 90 min.; 24, 48 h
Termoliza/ Umiditate	60°C/ 75%RH, 80°C/ 75%RH	60, 90 min.; 24, 48 h
Fotoliza	250 w/ m <sup>2</sup>	24, 48 h

### Modelul experimental

Studiile de degradare forțată trebuie să cuprindă toată gama de metode de liza (hidroliza oxidativă, hidroliza acidă, hidroliza bazică, fotoliza, termoliza), pentru a avea o imagine de ansamblu a tuturor posibilităților de degradare a compusului de interes și a produsului medicinal, evaluându-se astfel stabilitatea și conservabilitatea acestora.

Prin cumularea rezultatelor obținute în urma tuturor condițiilor de degradare se obțin informații asupra cailor de degradare a substanței de interes, facilitând punerea la punct a metodei de preparare și ambalare a produsului medicinal.

Condițiile inițiale se stabilesc pentru a se obține o degradare de aproximativ 10%, în funcție de rezultatele obținute putând interveni modificări ale concentrației agentului degradant și / sau timpului de expunere la acesta. Prepararea probelor pleacă de la concentrații ale substanței de interes cuprinse între 0.5 – 1 mg/ml.

Parametrii cromatografici urmăriți în studiile de degradare forțată sunt:

- aria,
- înălțimea,
- asimetria peak-ului de interes,
- rezoluția între peak-ul compusului de interes și peak-ul imediat anterior (sunt acceptate rezoluții mai mari decât 1.0),
- procentul de degradare,
- aria peak-ului standardului compusului de interes,
- numărul de talere teoretice și
- factorul de capacitate a coloanei (parametri care indică eficiența coloanei cromatografice și sensibilitatea metodei HPLC utilizată în studiu) [2, 10, 11].

Experimentele de degradare forțată se pot realiza și prin cumularea a două condiții – de exemplu cuplarea hidrolizei acide/ bazice cu termoliza, însă numai după ce au fost studiate separat. În cazul degradării oxidative cu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se recomandă lucrul la temperatura camerei, deoarece încălzirea

excesiva a peroxidului de hidrogen duce la formarea de radicali alcoxil. Radicalii alcoxil sunt foarte reactivi, amplificând procesul de degradare. Prin adăugarea, de exemplu, de

metanol în mediu, efectul oxidativ este dus la extrem (Tabelul 3).

**Tabelul 3.**

Model experimental de studiu a degradării forțate

Indicator de degradare	Substanța activă	Reagent adăugat	Condiții de lucru	Diluția	Concentrația finală
Standard de referință	1 ml soluție stoc 1 mg/ml standard	-	Diluare la concentrația finală	9 ml diluant pentru metoda HPLC	0.1 mg/ml
Soluție acidă	1 ml soluție stoc 1 mg/ml standard	1 ml HCl 0.1 N	90 min.	8 ml diluant pentru metoda HPLC	0.1 mg/ml
Soluție bazică	1 ml soluție stoc 1 mg/ml standard	1 ml NaOH 0.1 N	90 min.	8 ml diluant pentru metoda HPLC	0.1 mg/ml
Control acid	-	1 ml HCl 0.1 N	-	9 ml diluant pentru metoda HPLC	-
Control bazic	-	1 ml NaOH 0.1 N	-	9 ml diluant pentru metoda HPLC	-
Soluție oxidantă	1 ml soluție stoc 1 mg/ml standard	1 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%	15 min.	8 ml diluant pentru metoda HPLC	0.1 mg/ml
Control oxidant	-	1 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%	-	9 ml diluant pentru metoda HPLC	-
Căldură	1 ml soluție stoc 1 mg/ml standard	-	2 h - 60°C	9 ml diluant pentru metoda HPLC	0.1 mg/ml
Lumina	1 ml soluție stoc 1 mg/ml standard	-	60 min - 250 w/m <sup>2</sup>	9 ml diluant pentru metoda HPLC	0.1 mg/ml

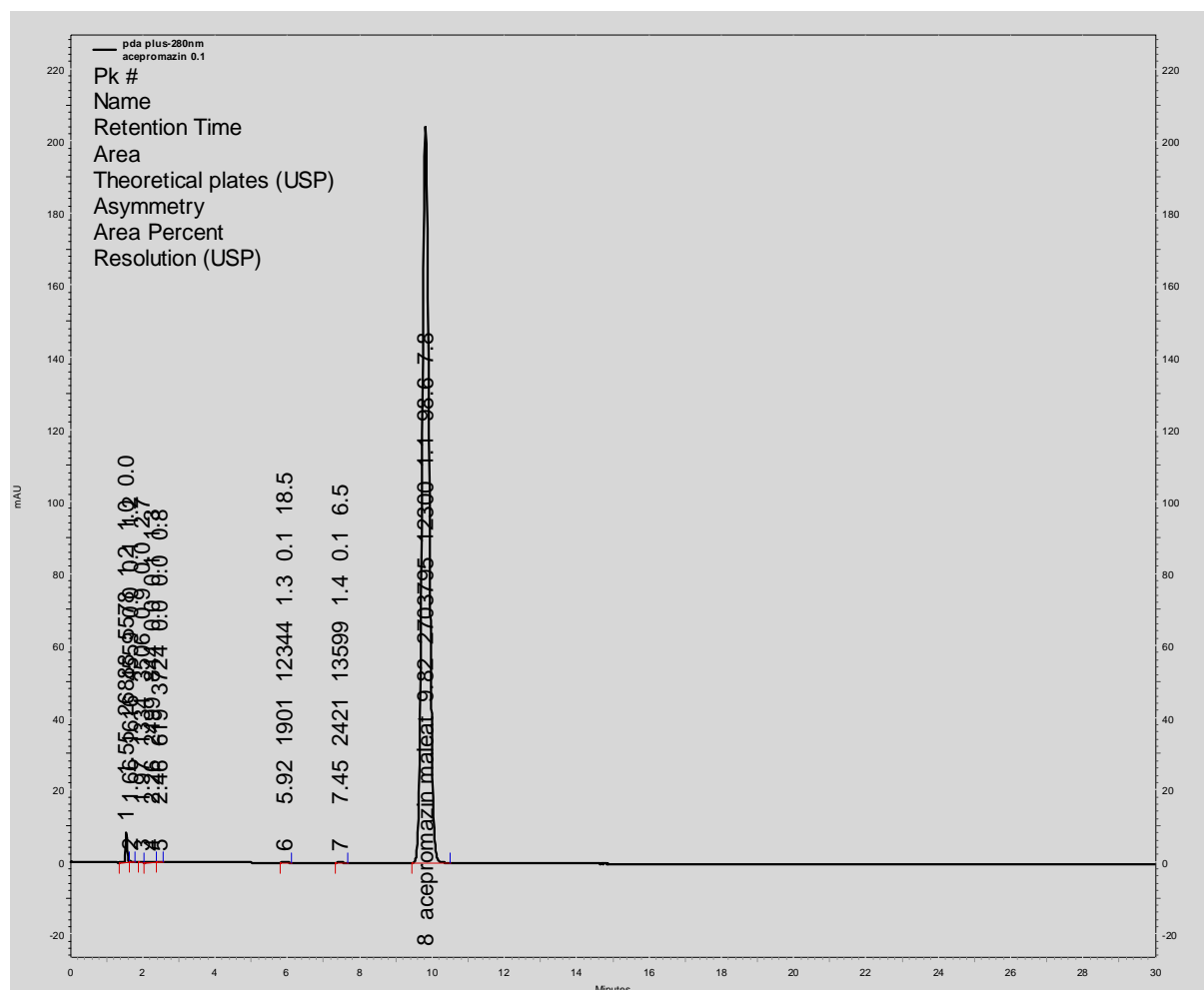


Figura 1. Compus activ nedeegradat

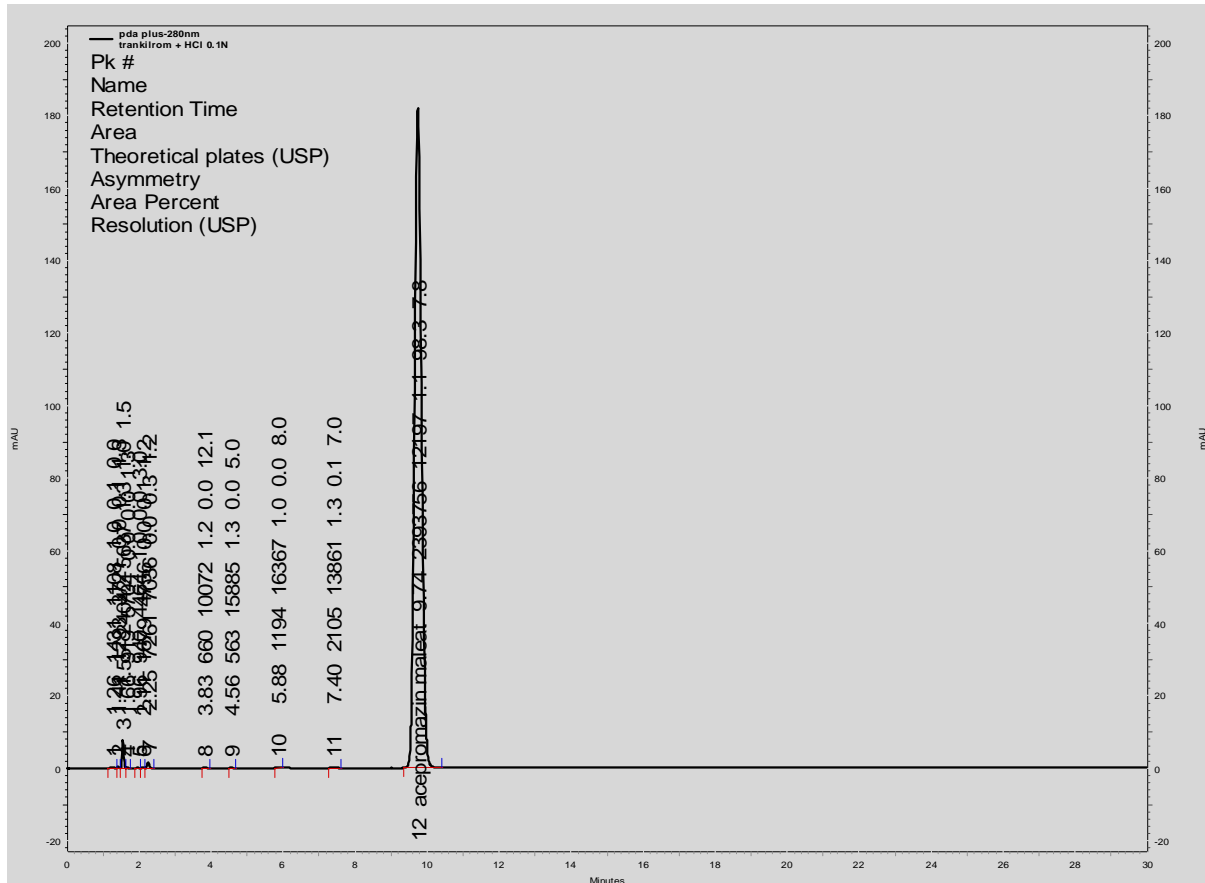


Figura 2. Degradare acidă

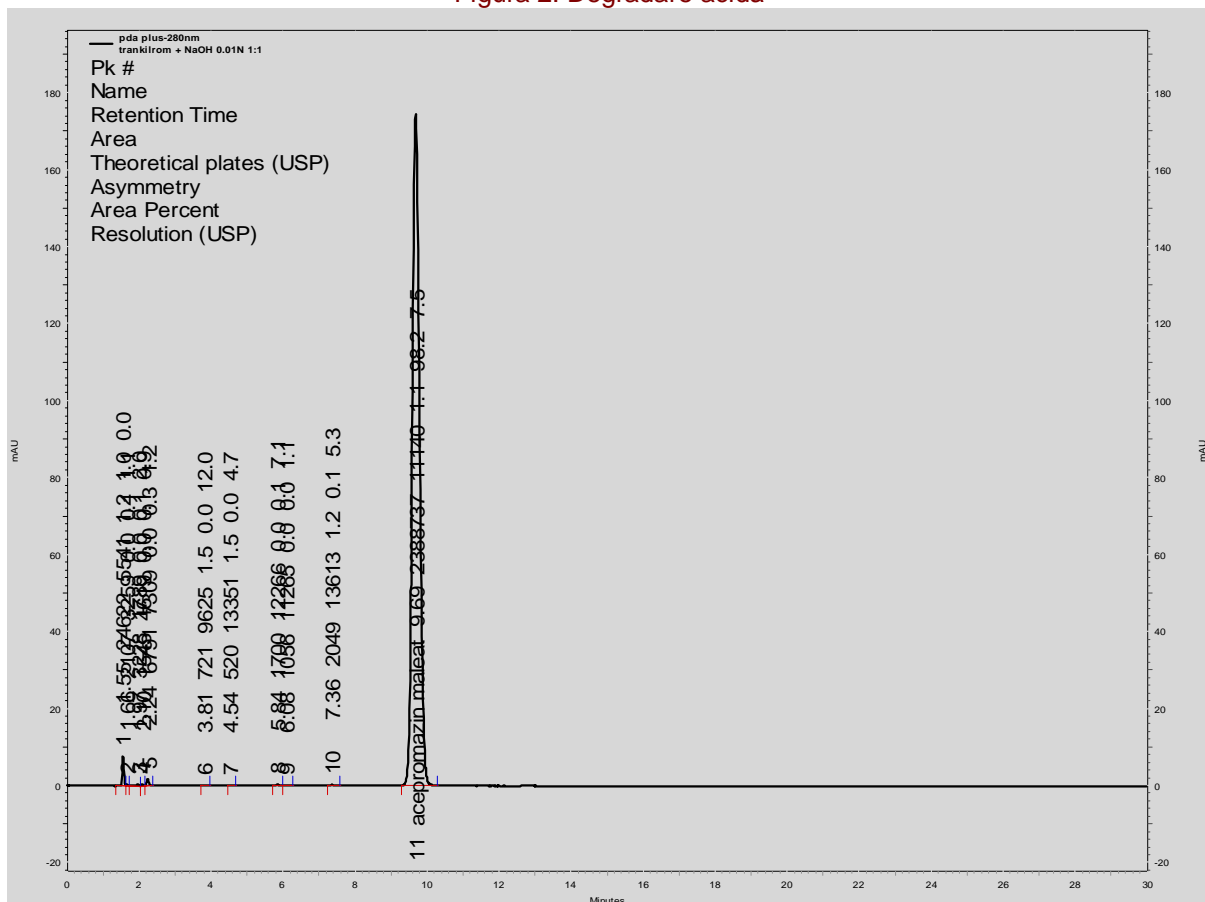


Figura 3. Degradare bazică

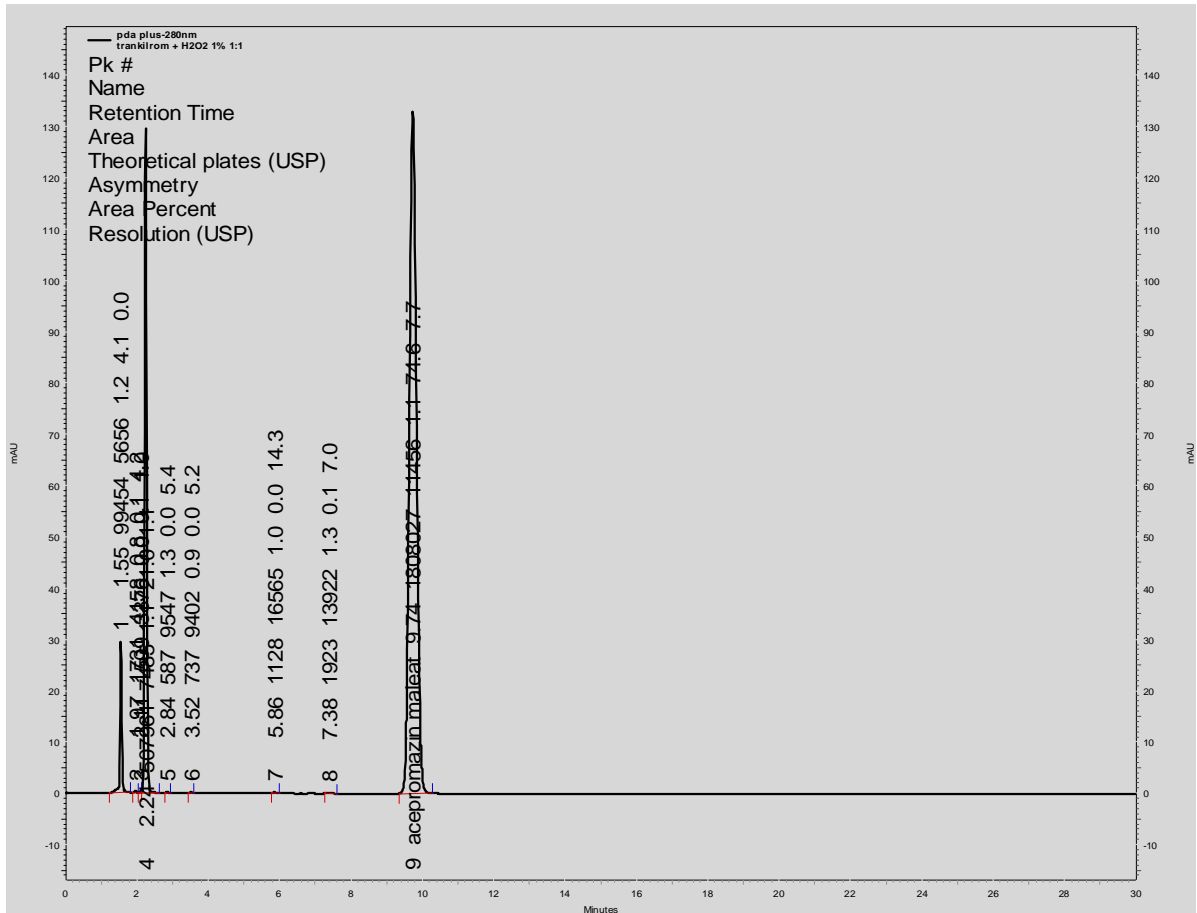


Figura 4. Degradare oxidativă

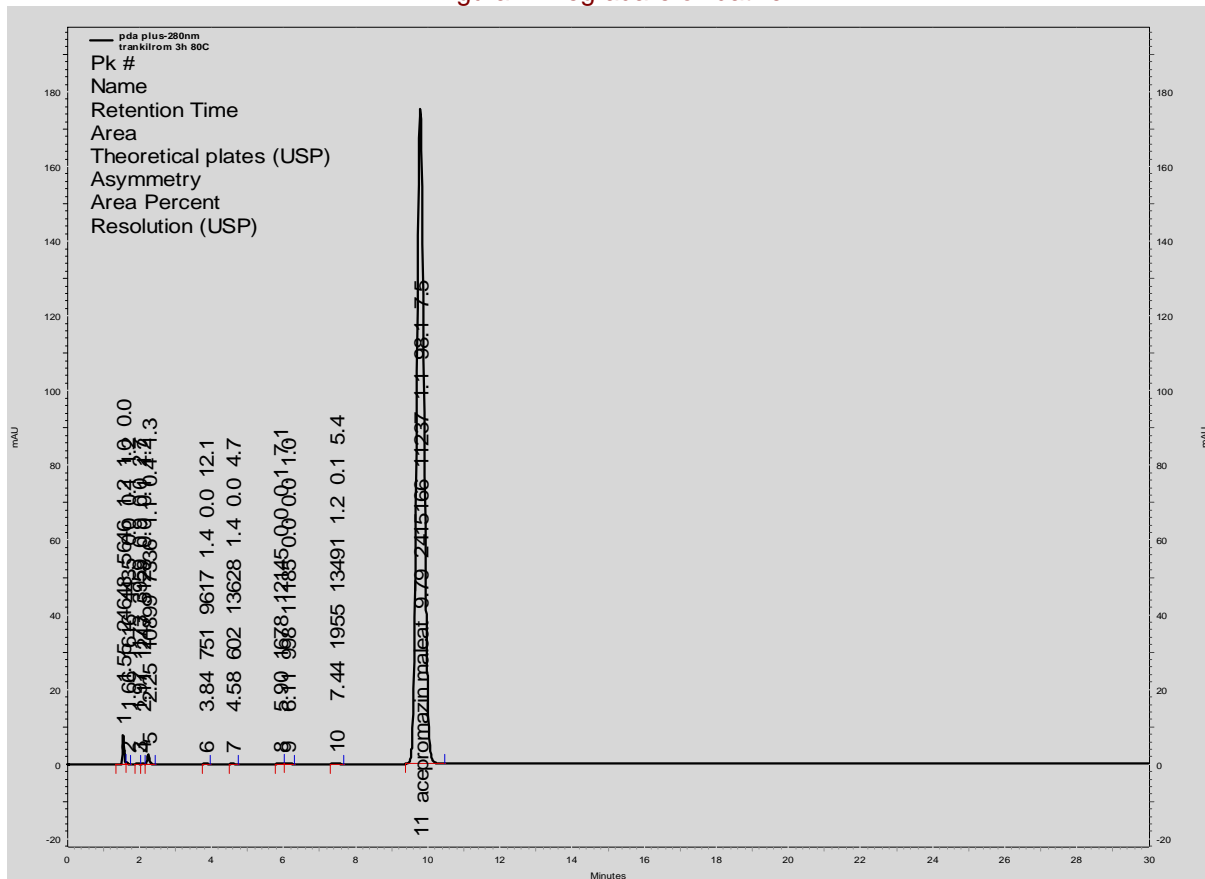


Figura 5. Degradare termică

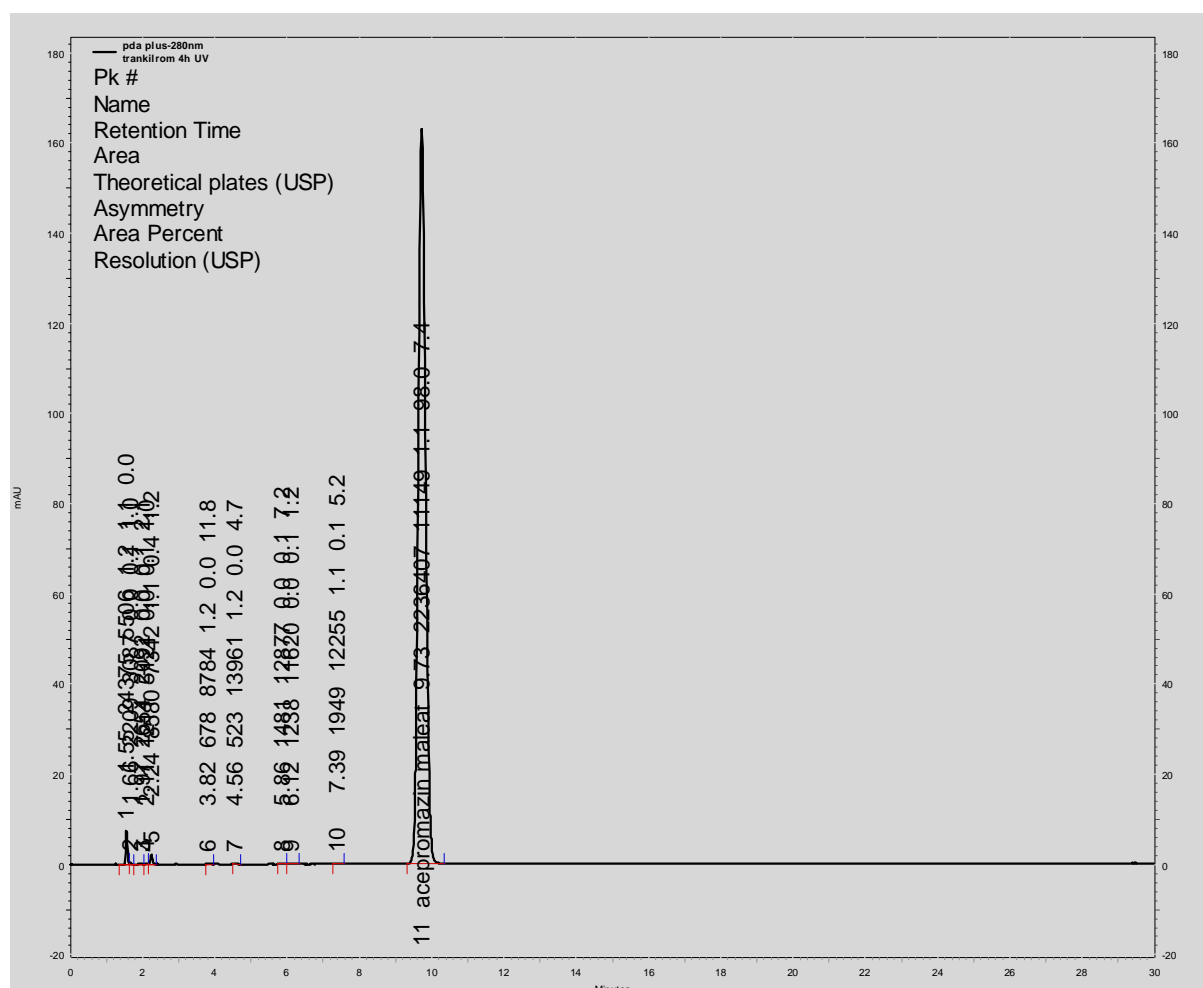


Figura 6. Degradare fotolitică

## Concluzii

Testele de stabilitate reprezintă un instrument de analiză important pentru determinarea condițiilor de stocare și conservabilitatea produselor medicinale.

Pe lângă testele de lungă durată efectuate pentru determinarea precisă a perioadei de valabilitate a produselor medicinale, se pot efectua studii accelerate, prin pastrarea produsului la temperatura și umidități excesive. Studiile de degradare forțată reprezintă un model de astfel de studii accelerate de testare a stabilității. Caracterizarea unui compus activ de interes, din punct de vedere chimic și structural face parte din testele de punere la punct a unei noi formule de preparat medicinal.

Studiile de degradare forțată sunt conduse astfel încât să permită realizarea optimă a unui profil de degradare.

Pentru evaluarea stabilității intrinseci și a profilului de degradare compusul chimic de interes este supus unor etape diferite de condiții de mediu accelerate.

Metodele HPLC reprezintă principalul instrument analitic pentru caracterizarea substanței de interes și a impurităților specifice și nespecifice.

În mod curent, aceeași metoda HPLC se poate aplica pentru studiul unei substanțe active și a unui produs medicinal care o conține, adesea, aceeași metoda putând fi utilizată și pentru studiul impurităților.

Totuși, determinarea cantitativă și puritatea pot fi realizate prin metode diferite.

Metoda HPLC aleasă trebuie să poată diferenția cu acuratețe și să cuantifice compusul de interes de impuritățile specifice și nespecifice.



## Bibliografie

1. **Banker GS, Rhodes CT** (2002). *Modern Pharmaceutics* – Fourth Edition. Rev. and Expanded. 2002: 152.
2. **Carr GP, Wahlich JC** (1990). A practical approach to method validation in pharmaceutical analysis. *J Pharm Biomed Anal*, 86: 613-618.
3. **FDA Guidance for Industry** (2003). INDs for Phase II and III Studies – Chemistry, Manufacturing, and Controls Information.
4. **FDA Guidance for Industry**, Analytical Procedures and Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services FDA, August 2000.
5. **Guideline** for submitting samples and analytical data for methods validation. Food and Drug Administration (1987). US Government Printing Office: 1990-281-794: 20818.
6. **ICH Q1A** (2003). Stability Testing of New Drug Substances and Products. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Drugs For Human Use, Geneva, Switzerland.
7. **ICH Q1B** (1996). Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Drugs For Human Use, Geneva, Switzerland.
8. **ICH Q2 (R1)** (1987). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Guideline for submitting samples and analytical data for methods validation. Food and Drug Administration, US Government Printing Office.
9. **ICH Q2 (R1)** Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology
10. **Jenke DR** (1996). Chromatographic method validation: a review of common practices and procedures II. *J. Liq. Chromat.* 19: 737-757.
11. **Kats M** (2005). Forced degradation studies: regulatory considerations and implementation. *Bio. Pharm. Int.*
12. **Reynolds DW, Facchine KL, Mullaney JF, Alsante KM, Hatajik TD, Motto MG** (2002). Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. *Pharm Tech* 2002: 48-56.
13. **Szepesi G** (1989). Selection of high-performance liquid chromatographic methods in pharmaceutical analysis. *J Chromatogr* 464: 265-278.