

Degradarea forțată a produsului Romprogestin 1 % pentru validarea metodei HPLC și evaluarea stabilității medicamentului

Forced degradation of Romprogestin 1 % for HPLC-method development and drug stability assessment

Mădălina Enciu, Viorica Chiurciu, Elena Gabriela Oltean, A.G.Nica
Romvac Company SA

Cuvinte cheie: HPLC, degradare forțată, progesteron, injectabil, validare, stabilitate
Key words: HPLC, forced degradation, progesterone, injectable, validation, stability

Rezumat

Degradarea forțată este o tehnică analitică aplicată unui medicament pentru a simula condiții mai severe decât cele existente în cazul unui studiu de stabilitate în condiții accelerate. Substanțele medicamentoase pot suferi degradări în timpul depozitării pe perioada de valabilitate; produșii de degradare și căile de degradare trebuie elucidate pentru a demonstra stabilitatea produsului medicinal. Soluția injectabilă uleioasă de progesteron este utilizată în zootehnie pentru sincronizarea estrului la rumegătoare sau în tratamentul unor manifestări clinice diverse la câini și pisici. Metodele chimice folosite pentru degradarea forțată a produsului Romprogestin 1 % soluție injectabilă au fost: hidroliza acidă, hidroliza bazică și oxidarea; ca metodă fizică a fost utilizată influența creșterii temperaturii. S-au evaluat anumiți parametri pentru validarea metodei HPLC (specificitate, liniaritate, limită de detecție etc.)

Abstract

Forced degradation is an analytical technique applied to a drug product in order to simulate conditions more severe than those in accelerated stability studies. Active substances may suffer degradation during storage over drugs shelf-life; degradation products and degradation pathways should be elucidated to demonstrate the stability of the medicinal product. The oily injection of progesterone is used to synchronize oestrus in ruminants or to treat various clinical manifestations in dogs and cats. Degradation of drug substances between 5 % and 20 % has been accepted as reasonable for validation of chromatographic assays [3]. The chemical methods used for forced degradation of Romprogestin 1 % injectable solution were: acid hydrolysis, basic hydrolysis and oxidation; the physical method used was the influence of temperature increase. Some parameters were evaluated for validation of the HPLC method (specificity, linearity, detection limit, etc.).

Introducere

Degradarea forțată este sinonimă cu degradarea intenționată și reprezintă o tehnică analitică utilizată la dezvoltarea unor medicamente inovative (cu substanțe active noi) [1,2] sau la evaluarea stabilității unor medicamente generice, ce conțin substanțe active bine-cunoscute ori cu utilizare îndelungată, pentru a putea caracteriza preparatul medicinal din punct de vedere al purității, eficacității și siguranței administrării.

Normativele compendiale ICH și FDA solicită ca validarea unei metode HPLC să

ofere informații asupra stabilității produsului medicinal analizat, procedura analitică având capacitatea de a detecta modificările proprietăților compușilor activi.

O astfel de metodă trebuie să cuantifice cu exactitate compușii activi, fără interferențe din partea produșilor de degradare sau a impurităților potențial prezente în produsul medicinal veterinar. Informațiile furnizate de către studiile de degradare aplicate compusului activ și produsului farmaceutic final trebuie să demonstreze specificitatea metodei analitice față de eventuale impurități.

În general, a fost acceptată ca rezonabilă, pentru validarea metodelor cromatografice, degradarea substanțelor medicamentoase între 5 % și 20 % [3].

În cadrul metodei cromatografice-HPLC, ca indicatori pentru comparare și evaluare se pot folosi următorii parametri: timpul de retenție, aria peak-ului cromatografic, prezența peak-urilor suplimentare.

Literatura de specialitate citează o multitudine de metode chimice sau fizice de degradare forțată [4,5] (hidrolize acido-bazice, oxidări, fotolize, creșterea temperaturii).

Preparatele hormonale injectabile de uz veterinar trebuie să îndeplinească condițiile generale (precizate de farmacopee etc.) privind puritatea, stabilitatea, eficacitatea și siguranța utilizării.

1. Materiale si metode

1.1. Reactivi standard

- **Progesteronul CRS** (compus de referință standard) utilizat pentru verificarea abilității sistemului (system suitability), lot 1.0 (European Pharmacopoeia).
- **Progesteronul** (grad de puritate farmaceutică), lot HTT 170506, valabilitate 17.05.2022 luat în lucru, a fost furnizat de Offichem (Olanda).
- **Progesteronul cu conținut de impuritate H** (European Pharmacopoeia) utilizat drept standard pentru controlul limitei de impurități.

1.2. Reactivi HPLC și pentru degradarea chimică

- **Acidul fosforic și acetoneitrilul** cu grad de puritate HPLC, au fost furnizate de Merck (Germania).
- **Apa** pentru prepararea soluțiilor a fost obținută *in-house* cu un system Milli-Q (Millipore, USA).
- Pentru degradarea prin hidroliza acidă a fost folosit **acidul clorhidric** furnizat de Merck.

- Pentru degradarea prin hidroliza bazică a fost folosit **hidroxidul de sodiu** furnizat de Merck.
- Pentru degradarea prin oxidare a fost folosită **apa oxigenată**, furnizată de Merck.

Studiul de degradare chimică au fost realizate în paralel pe soluțiile standard și probă (tabelul 1).

1.3. Degradarea fizică

Metoda fizică aleasă a fost **termoliză** (supunerea soluțiilor de investigat creșterii temperaturii, pentru o perioadă determinată, la o turație stabilită). Studiul de degradare fizică a fost realizat în paralel pe soluțiile standard și pe soluțiile de probă (tabelul 1).

Tabelul 1

Condiții de degradare aplicate produsului Romprogestin 1 %

Agent de degradare	Proprietăți
Hidroliză acidă cu soluție HCl	concentrații 1 N, 0,1 N
Hidroliză bazică cu soluție NaOH	concentrații 1 N, 0,1 N
Oxidare cu soluție H ₂ O ₂	concentrație 3 %
Termoliză	70°C, timp 3 h la o turație de 80 rpm

1.4. Produsul medicinal veterinar suspus testării

Produsul medicinal veterinar, soluție uleioasă injectabilă, **Romprogestin 1%**, este fabricat de Romvac Company SA fiind produs ce se comercializează în mod curent (autorizație de comercializare nr. 150393 din 15.09.2015).

1.5. Alte materiale și echipamente

Pentru pregătirea soluțiilor de lucru, pentru manipularea și rularea soluțiilor de lucru au fost mai fost folosite:

- pipete calibrate,
- sticlărie volumetrică,
- filtre PVDF,
- coloană cromatografică,
- balanță analitică de precizie,
- baie cu ultrasunete.

Tabelul 2

Condiții de separare cromatografică aplicate în cazul produsului Romprogesterin 1 %.

Parametru	Condiții de lucru
Coloana	Hypersil Gold C18 cu mărimea particulelor 5μ L = 100 mm, DI = 4,6 mm
Faza mobilă	Component A: acetonitril - 60% Component B: H ₃ PO ₄ – 40 %
Flux (debit)	1,4 ml/min
Detector	UV-VIS cu citire la 242 nm
Volum de injectare	5 μl
Concentrația de lucru	0,1 mg/ml
Temperatura de lucru	25 °C

Prepararea soluțiilor de probe

Într-un balon cotate de 10 ml conținând aprox. 8 ml solvent acetonitril / apă în raport 3/2, se pipetează 1 ml produs Romprogesterin 1 %, se ultrasonează 15 min și se aduce la semn cu același solvent (rezultând soluția mamă progesteron - 1 mg/ml).

Din această soluție se pipetează 1 ml într-un balon cotate de 10 ml și se aduce la semn cu solvent acetonitril/apă în raport 3/2 (soluția de lucru – progesteron 0,1 mg/ml).

Înainte de injectare se filtrează prin filtru de PVDF de 0,45 μm.

Prepararea soluțiilor standard

Progesteron CRS; 10 mg progesteron CRS se cântăresc în balon cotate de 10 ml și se aduc la semn cu acetonitril/apă în raport 3/2.

Din această soluție se măsoară un volum de 1 ml care se transferă într-un balon cotate de

10 ml și se aduce la semn cu soluție acetonitril/apă în raport 3/2.

Progesteron cu impuritatea H; într-un balon cotate de 10 ml se cântăresc 10 mg substanță de referință, se adaugă 5 ml de acetonitril, se ultrasonează pentru omogenizare și se aduce la volum final cu amestec acetonitril/ apă în raport 3/2. Din această soluție se ia 1 ml care se aduce la balon cotate de 10 ml cu fază mobilă. Se injectează un volum de 5 μl.

Curba de calibrare

Pentru dozarea progesteronului a fost realizată o curbă de calibrare pornind de la o soluție stoc de progesteron cu concentrația 1 mg/ml. Din această soluție se fac diluții progresive în faza mobilă pentru obținerea următoarelor concentrații: 0,02, 0,04, 0,08, 0,10 și 0,12 mg/ml. Toate probele au fost realizate în triplicat.

Toate soluțiile se prepară *ex tempore*.

2. Rezultate și discuții

Sistemul HPLC a fost supus testării pentru puterea de separare și detecție a progesteronului însoțit de impuritatea H, în condițiile de lucru (tabelul 2) rezultând cromatograma din figura 1.

Sistemul cromatografic permite integrarea ariilor și calculul concentrației progesteronului (substanța activă a produsului medicinal veterinar) pe baza curbei de calibrare prezentată în figura 2.

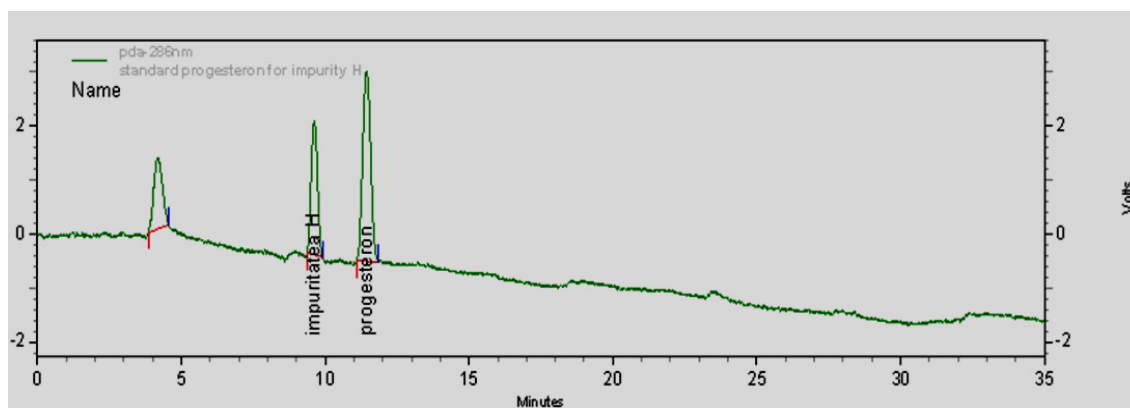


Figura 1. Cromatograma soluției de progesteron cu impuritate H

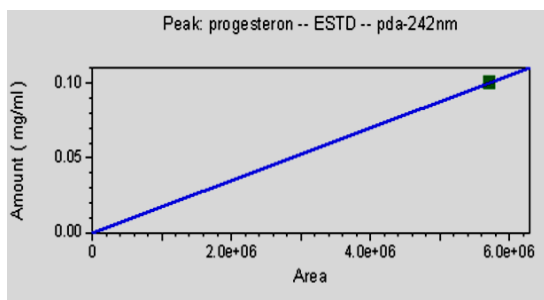


Figura 2. Curba de calibrare pentru progesteron din soluția de progesteron cu impuritate H

Abilitatea sistemului HPLC pentru determinarea liniară a concentrațiilor de progesteron (ca parte a procesului de validare) a fost investigată folosind domeniul de concentrație: 0,02-0,04-0,08-0,10-0,12 mg/ml.

Ecuația de gradul I (ecuația dreptei de regresie liniară) $y = a \cdot x + b$,

în care:

- **x** reprezintă concentrația compusului activ în mg/ml,
- **y** este înălțimea picului cromatogramei, **a** reprezintă panta dreptei iar
- **b** reprezintă ordonata la origine (tabelul 3), permite evaluarea liniarității răspunsului sistemului cromatografic.

Prepararea soluțiilor de lucru pentru degradările acidă, bazică, oxidativă și termică a produsului medicinal veterinar Romprogestin 1 % s-a făcut după schema prezentată în tabelul 4.

Tabelul 3

Analiza regresiei datelor de cuantificare pentru concentrația de progesteron în metoda HPLC

Parametri statistici	Valori realizate
Ecuția de regresie	$y = 1,91295e-008 x - 0,000487191$ $y = 1,90924e-008 x - 0,000474520$ $y = 1,90570e-008 x - 0,000636984$
Eroarea standard a pantei	0,003625e-008
Eroarea standard a ordonatei la origine	9,03632e-5
Coefficientul de corelație (r)	0,999834 0,999411 0,999625
Intervalul de concentrație (mg/ ml)	0,02 - 0,04 - 0,08 - 0,10 - 0,12 mg/ml

Tabel 4

Prepararea soluțiilor de probe pentru studiul degradării produsului Romprogestin 1 %

Indicator degradare	Substanța activă	Reactiv adăugat /condiții degradare	Volum final (ml)
Soluție mamă Romprogestin 1 % progesteron 1 mg/ml	1 ml sol. 1 mg/ml progesteron	fără degradant	10
Soluție HCl 0,1N	1 ml sol. 1 mg/ml progesteron	1 ml HCl 0,1 N	10
Soluție HCl 1N	1 ml sol. 1 mg/ml progesteron	1 ml HCl 1 N	10
Control hidroliză acida	-	1 ml HCl 0,1 N	10
Soluție NaOH 0,1N	1 ml sol. 1 mg/ml progesteron	1 ml NaOH 0,1 N	10
Soluție NaOH 1N	1 ml sol. 1 mg/ml progesteron	1 ml NaOH 1 N	10
Control hidroliză bazică	-	1 ml NaOH 0,1 N	10
Soluție H ₂ O ₂ 3 %	1 ml sol. 1 mg/ml progesteron	1 ml H ₂ O ₂ 3 %	1 0
Control agent oxidant	-	1 ml H ₂ O ₂ 3 %	10
Termoliză	1 ml sol. 1 mg/ml progesteron	70 °C 2 h, 80 rpm	10

Produsul Romprogestin 1 % a fost supus degradării forțate, chimic și fizic, iar parametrii cromatografici sunt prezentați în tabelul 5.

Cromatogramele și curbele de calibrare pentru degradările oxidativă, acidă și bazică sunt prezentate în figurile 3, 4, 5, 6 și 7.

Se observă impuritățile posibile care sunt nesemnificative (în termeni de arie) în raport de peak-ul principal al progesteronului.

Impuritățile identificate de softul cromatografic și marcate ca atare (prin

termenul "impuritate") în cromatogramele prezentate în figurile 3, 4, 5, 6 și 7 reprezintă impuritățile aflate în standardul intern (standardul intern este diferit de substanța de interes-progesteronul), adăugat intenționat în soluțiile testate, pentru testarea abilității sistemului cromatografic (calitativ și cantitativ).

Această substanță folosită ca standard intern în cadrul acestui studiu nu este nominalizată în acest articol.

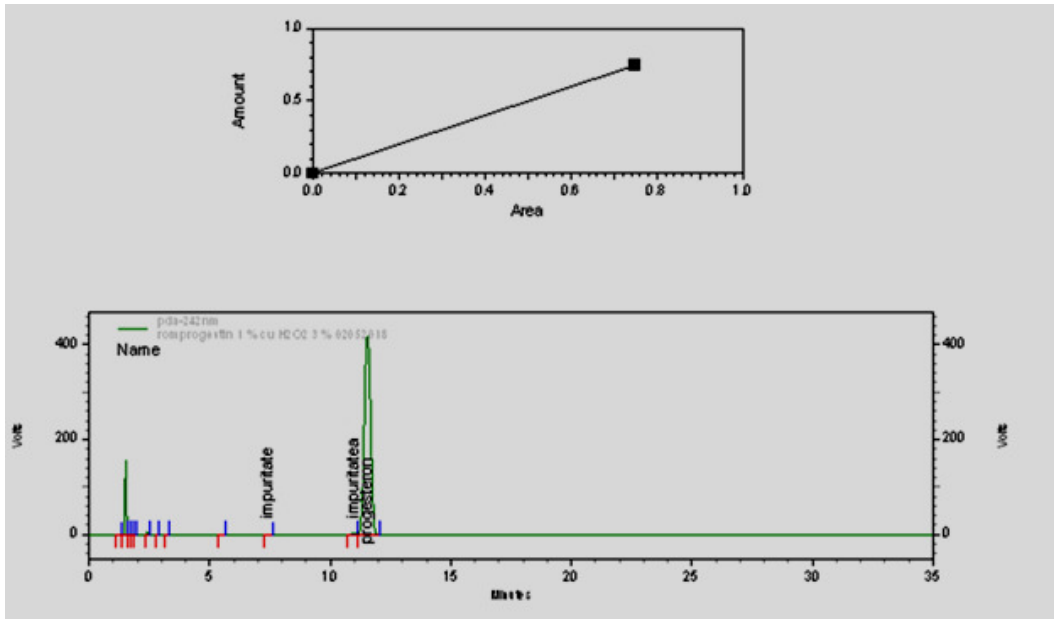


Figura 3. Cromatograma pentru degradarea oxidativă a produsului Romprogestin 1 %

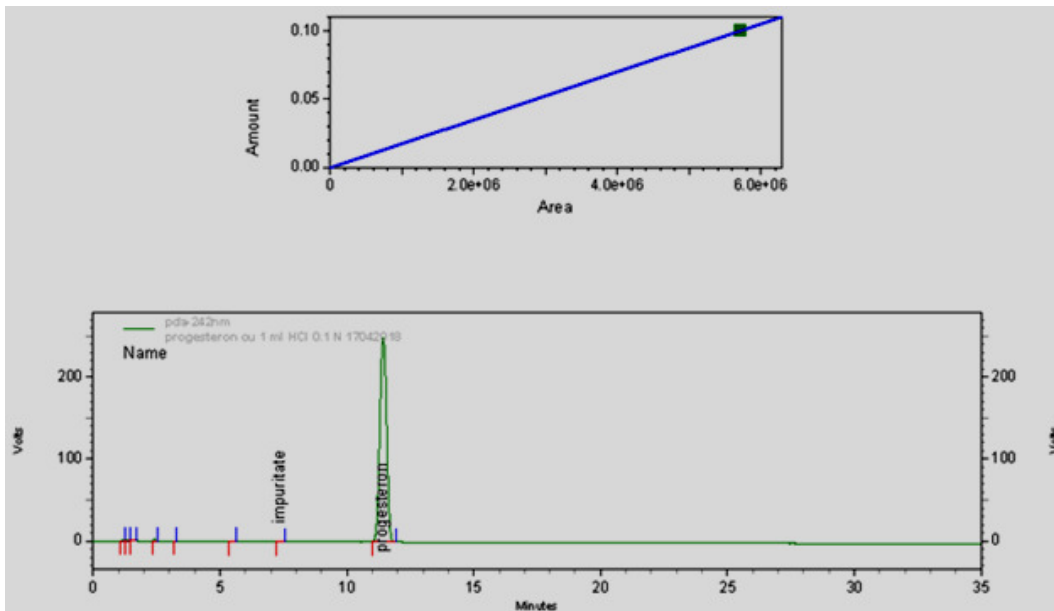


Figura 4. Cromatograma pentru degradarea acidă (HCl 0,1 N) a produsului Romprogestin 1 %

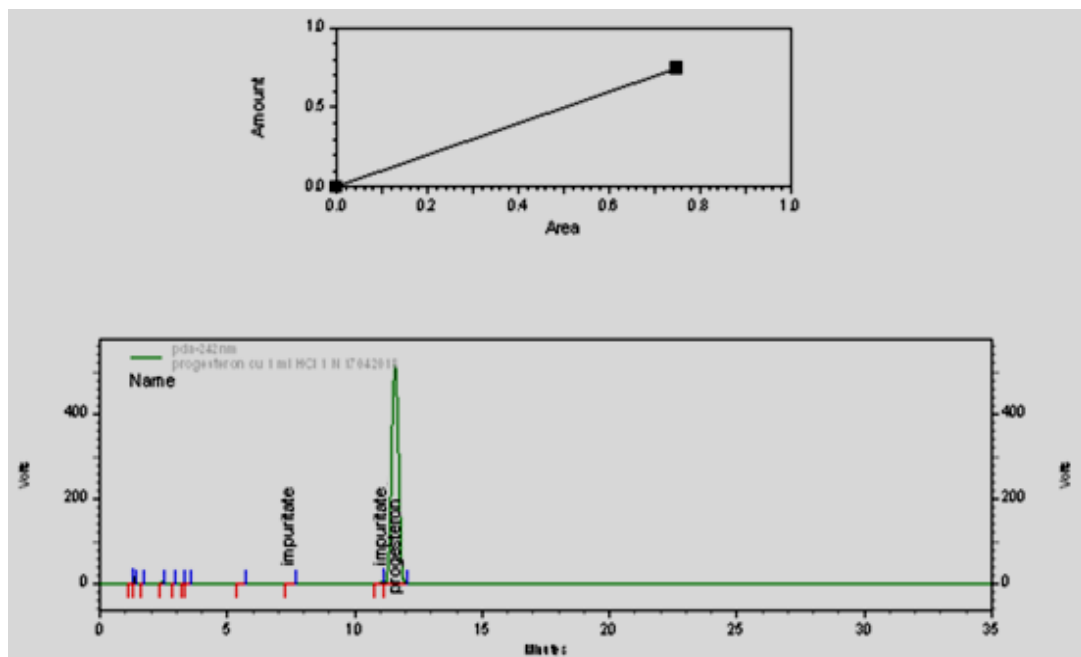


Figura 5. Cromatograma pentru degradarea acidă (HCl 1 N) a produsului Romprogestin 1 %

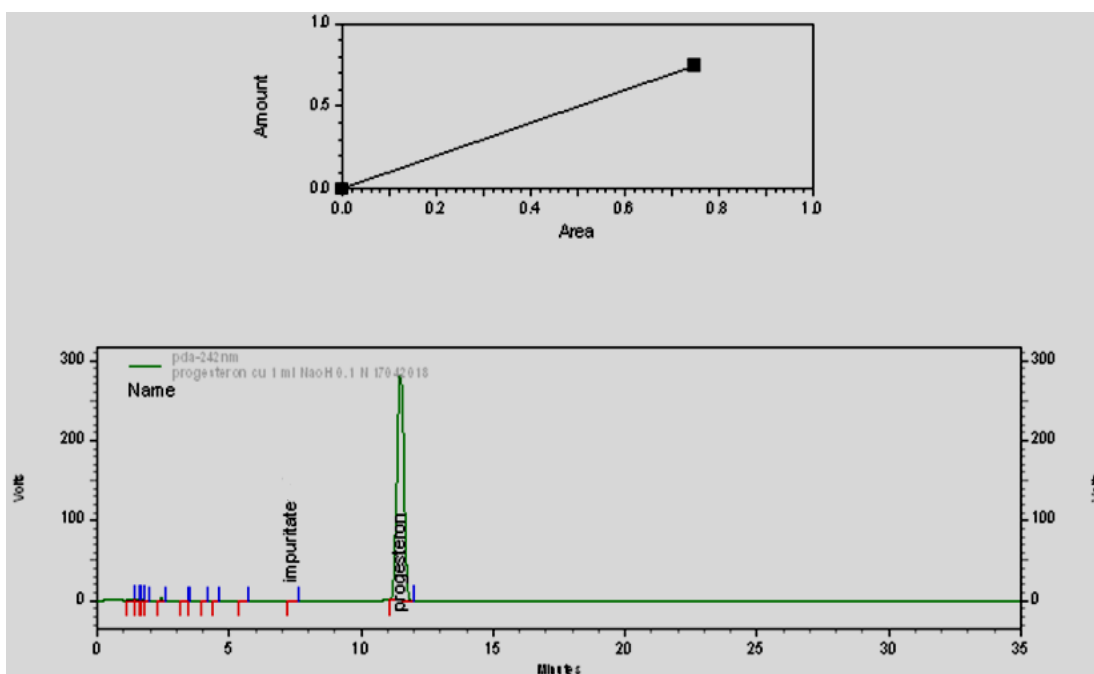


Figura 6. Cromatograma pentru degradarea bazică (NaOH 0,1 N) a produsului Romprogestin 1 %

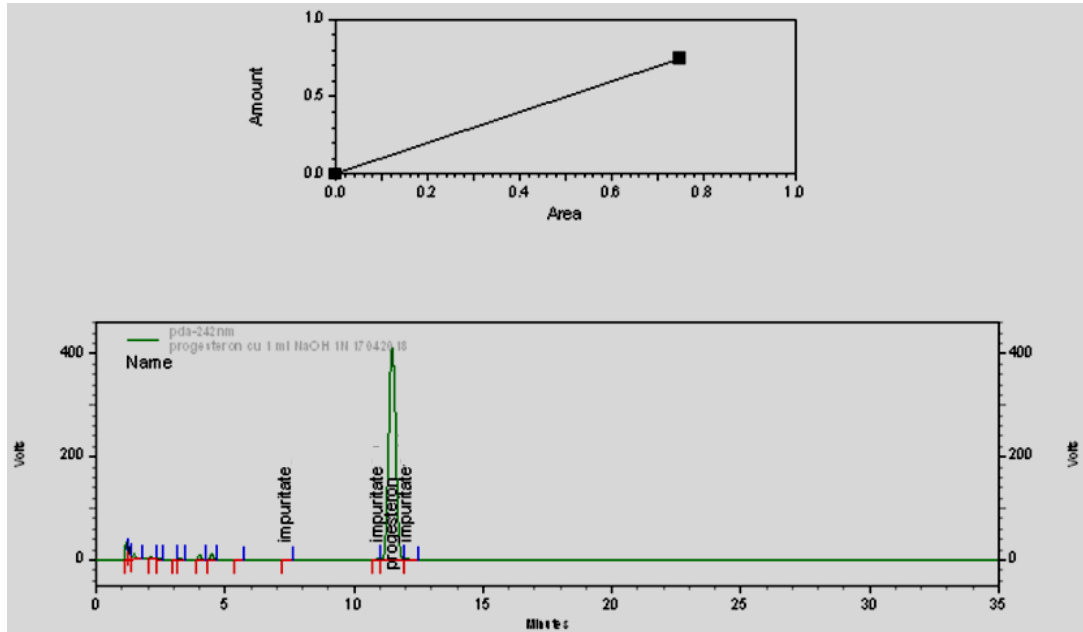


Figura 7. Cromatograma pentru degradarea bazică (NaOH 1 N) a produsului Romprogestin 1 %

Tabel 5

Studiul degradării forțate a progesteronului din Romprogestin 1 %

Compus activ/ Impuritati specifice	Factor de degradare											
	Degradare acidă conc. 0,1N			Degradare bazică conc. 0,1N			Degradare oxidativă conc. 3 %			Degradare termică 70 °C		
	T _R	A %	R	T _R	A %	R	T _R	A %	R	T _R	A %	R
Progesteron	11,4	99,23	10,3	11,5	99,38	10,2	11,6	93,54	1,1	11,7	99,15	1
	Degradare acidă conc. 1 N						Degradare bazică conc. 1 N					
Impuritatea H Progesteron	-	-	-	-	-	-	T _R	A %	R	T _R	A %	R
	11,6	98,71		0,9	11,6	99,02	9,6					
	Produs nedegradat											
Impuritatea H Progesteron	-	-	-	-	-	-	T _R	A %	R	T _R	A %	R
	11,5	99,2	10									

Progesteronul CRS a fost supus degradării forțate, chimic și fizic, iar parametrii cromatografici apar în tabelul 6.

Tabel 6

Studiul degradării accelerate a compusului activ progesteron CRS.

Compus activ/ impuritati specifice	Factor degradare											
	Degradare acidă conc. 0,1 N			Degradare bazică conc. 0,1 N			Degradare oxidativă conc. 3 %			Degradare termica		
	T _R	A%	R	T _R	A %	R	T _R	A %	R	T _R	A %	R
Impuritatea H progesteron	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11,3	99,13	28,2	11,5	97,88	15,6	11,4	91,3	23,5	11,7	99,99	30,3
	Degradare acidă conc. 1 N						Degradare bazică conc. 1 N					
Impuritatea H progesteron	-	-	-	-	-	-	T _R	A %	R	T _R	A %	R
	11,5	98,12	15,7	11,5	98,1	15,7						
	Produs nedegradat											
Impuritatea H progesteron	-	-	-	-	-	-	T _R	A %	R	T _R	A %	R
	11,6	99,97	29,6									

Performanța metodei cromatografice HPLC aleasă pentru studiul de degradare aplicat progesteronului din produsul medicinal veterinar Romprogestin 1% a fost demonstrată prin calcularea numărului talerelor teoretice specifice compusului de interes, pe soluțiile de standard, respectiv de probă (tabel 7).

Tabel 7

Valorile talerelor teoretice specifice progesteronului, în studiul de degradare forțată

Analit	Proba	Standard
Parametru fizico chimic	Talere teoretice	Talere teoretice
Compus nedegradat	7896	8385
Degradare acida 0,1 N	8243	7743
Degradare acida 1 N	8258	7956
Degradare bazica 0,1 N	8459	8032
Degradare bazica 1 N	7300	8160
Degradare oxidativa	8901	7677
Degradare termica	8662	8675

3. Concluzii

Studiul de degradare forțată reprezintă un model de studiu care este parte componentă a studiilor de testare a stabilității unui produs medicinal veterinar [6].

În urma studiului efectuat pe produsul farmaceutic Romprogestin 1%, soluție injectabilă s-a constatat că produsul este stabil la temperatură (la valoarea investigată) și în condiții de degradare acidă/bazică slabă.

Degradarea pe cale chimică nu afectează metoda de separare a compusului activ (progesteronul), observabil din valorile constante ale rezoluției.

În urma acțiunii chimice de degradare indusă forțat nu apar produși secundari care să interfereze cu compusul de interes studiat și cu impuritatea specifică acestuia.

În urma degradării forțate nu apar compuși suplimentari care să influențeze negativ produsul, concentrațiile acestor

compuși exprimate ca arie, fiind neesențiale în raport cu substanța activă.

Valorile de arie procentuală ale eventualelor impurități apărute în urma degradării forțate nu depășesc valoarea de 5%.

Metoda HPLC utilizată pentru studiul limitei de impurități și a produșilor de degradare aplicată progesteronului din produsul farmaceutic Romprogestin 1%, soluție injectabilă este specifică (înalt selectivă) și sensibilă, pe baza valorilor rezoluției și a numărului de talere teoretice.

Bibliografie

1. **FDA Guidance for Industry**, (2000), Analytical Procedures and Methods Validation (draft guidance), August.
2. **ICH guidelines Q1A (R2)**, (2003). Stability Testing of New Drug Substances and Products (revision 2), November.
3. **Szepesi G** (1989). Selection of high-performance liquid chromatographic methods in pharmaceutical analysis. III. Method validation, *J Chromatogr*, 464:265–278.
4. **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*, 26 (2):48-56.
5. **Blessy M, Patel RD, Prajapati PN, Agrawal YK** (2014). Review Paper: Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review Blessy, *Journal of Pharmaceutical Analysis*;4(3):159–165.
6. **Oltean EG** (2014) Determination of impurities and degradation products from veterinary medicinal products by HPLC method, *Medicamentul Veterinar / Veterinary Drug* 8(1), mai - iunie.