

Jakość odtwórczych produktów diabetologicznych. Porównanie metod stosowanych do oceny zanieczyszczeń w produktach z glimepirydem

Jadwiga Dudkiewicz Wilczyńska, Karolina Nowak, Elżbieta Anuszewska

Zakład Biochemii i Biofarmaceutyków, Narodowy Instytut Leków, Warszawa

Adres do korespondencji: Jadwiga Dudkiewicz Wilczyńska, Zakład Biochemii i Biofarmaceutyków, Narodowy Instytut Leków, 00-725 Warszawa, ul. Chełmska 30/34, e-mail: jadwig@il.waw.pl

Wstęp

Odtwórcze produkty lecznicze, zgodnie z przyjętą definicją, powinny posiadać tę samą co lek oryginalny jakość, skuteczność i bezpieczeństwo stosowania, czyli powinny być terapeutycznie ekwiwalentne, co pozwala na wymienną stosowania. Produkt odtwórczy powinien zawierać tę samą substancję czynną, choć może ona pochodzić od innego wytwórcy i może zawierać inne substancje pomocnicze niż użyte w leku oryginalnym. W wielu dyskusjach podnoszony jest problem jakości leków odtwórczych i ich skuteczności, w porównaniu z lekami oryginalnymi. W celu wykazania biorównoważności leku odtwórczego z lekiem odniesienia (lek oryginalny) wykonywane jest badanie dostępności biologicznej *in vivo*. Panuje obiegowe przekonanie, że lek odtwórczy jest gorszy od leku oryginalnego, mimo że wymagania rejestracyjne narzucają tym produktom wymóg tożsamości z lekiem odniesienia i nie gorszej od niego jakości. Jednym z zasadniczych czynników decydujących o jakości produktu leczniczego jest ilość zanieczyszczeń organicznych. W produktach leczniczych zawsze obecne są w śladowych ilościach zanieczyszczenia, definiowane jako substancje zawarte w produkcie, które nie stanowią substancji czynnej (API – *Active Pharmaceutical Ingredient*) ani nie są substancją pomocniczą użytą do produkcji danego farmaceutyku. W monografiach farmakopei (Ph. Eur., USP, JP, BP) uwzględnione jest oznaczanie zanieczyszczeń organicznych w substancjach farmaceutycznych, dla których zostały ustalone dopuszczalne limity i opisane metody analityczne. Obecnie Farmakopea Europejska jest najbardziej zaawansowaną farmakopeą na świecie pod względem oceny zanieczyszczeń farmaceutycznych

Quality of generic diabetological medical product. Comparison of analytical methods uses to evaluation related substances of glimepiride · The contents of organic impurities are one of the essential parameters decisive about quality of medical products. The aim of the work was comparison of analytical methods for detected impurities in generic medical products available for therapy in type 2 diabetes. Two different generic anti-diabetic products were investigated. In this study were used four methods HPLC to identify and quantitatively determine impurities glimepiride. There was compared efficiency chromatographic conditions to separate each impurity and estimate content of impurity in medical products. Comparable quality of research products was proved.
Keywords: Glimepiride, related impurities, quality generic product.

© Farm Pol, 2009, 65(9): 607–611

i zawiera wykaz zanieczyszczeń w wielu monografiach substancji aktywnych, w tym glimepirydu. Nie oznacza to jednak, że Ph. Eur. zawiera informacje dotyczące wszystkich zanieczyszczeń obecnych w danej substancji aktywnej, ponieważ ich ilość i rodzaj w dużej mierze są uzależnione od zastosowanej metody wytwarzania i użytych substancji wyjściowych. W Monografii Ogólnej 5.10 Farmakopei Europejskiej znajduje się zapis, że „Jeśli w substancji aktywnej występują zanieczyszczenia inne niż wyszczególnione, producent substancji odpowiedzialny jest za przeprowadzenie badań ich zawartości i właściwości”. Wymagania zawarte w monografii ogólnej „Substancje do użytku farmaceutycznego (2034)” są powiązane z wymaganiami zawartymi w Wytycznych ICH Q3A (R1). Ponadto zostały opracowane Wytyczne dla przemysłu farmaceutycznego – ANDA

Tabela 1. Charakterystyka metod analitycznych stosowanych do oznaczania zanieczyszczeń glicemipirydu w produktach leczniczych

Warunki chromatograficzne	Metoda I ^[1,3,4]	Metoda II	Metoda III ^[2]	Metoda IV ^[3]
Faza stała	C18 (e), 4µm, 4,0 × 250 mm	Zorbax SB C18, 5µm, 4,6 × 250 mm	C8 (2), 5µm, 4,0 × 250 mm	LiChrosfer 100 DIOL, 5µm, 4,0 × 250 mm
Faza ruchoma	ACN: NaH ₂ PO ₄ roztwór, pH 2,5, (1:1)	THF: woda: kwas trifluoroctowy (350: 650: 0,8)	KH ₂ PO ₄ roztwór, pH 7,0: ACN: THF (73: 18: 9)	2-propanol: heptan: kwas octowy bezwodny (100:899:1)
Przepływ fazy ruchomej	1,0 ml/min	1,5 ml/min	1,0 ml/min	1,0 ml/min
Temp. kolumny	25°C	35°C	35°C	25°C
Objętość nastrzyku	20 µl	25 µl	25 µl	10 µl
Detekcja, długość fali	UV, 228 nm	UV, 228 nm	UV, 228 nm	UV, 228 nm
Czas analizy	30 min	45 min	90 min	30 min

(ang. *Abbreviated New Drug Applications* – skrócone procedury zgłaszania produktów leczniczych) odnoszące się do zanieczyszczeń w odtwórczych produktach leczniczych.

W Farmakopei Europejskiej rozróżnione są różne typy zanieczyszczeń. Wśród zanieczyszczeń wyróżniono „wyszczególnione” i tak zwane „inne”, rozumiane jako „każde inne, niż znane zanieczyszczenie” lub przyjmuje się bardziej ogólne wymagania określane jako „jakiegokolwiek zanieczyszczenia”. W produkcie leczniczym mogą być obecne zanieczyszczenia pochodzące z substancji czynnej i dodatkowo produkty degradacji, powstające w trakcie przechowywania produktu, a także zanieczyszczenia pochodzące od substancji pomocniczych. Badania zmierzające do potwierdzenia ich obecności lub nieobecności, bądź oznaczenie ich zawartości są bardzo ważne z powodu potencjalnego ryzyka, jakie stwarzają. Zanieczyszczenia mogą być farmakologicznie lub chemicznie aktywne, mogą również wzmacniać lub osłabiać skuteczność farmakologiczną API. Konieczne jest przeprowadzenie badania w celu ustalenia, czy zawartość zanieczyszczeń w produkcie leczniczym (zanieczyszczenia procesowe i produkty degradacji) nie przekracza wartości granicznych, ustalonych dla przyjętego okresu przechowywania produktu. Każdy produkt leczniczy posiada własną dokumentację rejestracyjną, w której zawarte są wymagania jakościowe (specyfikacja) oraz kryteria oceny powiązane ze wskazanymi metodami analitycznymi. W konsekwencji do

oceny określonych parametrów jakości np. zawartości zanieczyszczeń, mogą być stosowane różne metody analityczne.

Celem niniejszej pracy było porównanie metod analitycznych wskazanych do oznaczania zawartości zanieczyszczeń produktów leczniczych stosowanych w terapii cukrzycy typu II. Produkty diabetologiczne, w tym zawierające glicemipiryd, są przeznaczone do przewlekłego stosowania, z tego względu bardzo pożądane jest dążenie do coraz wyższej ich jakości.

W pracy przeprowadzono oznaczanie zawartości zanieczyszczeń glicemipirydu, techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), w wybranych warunkach chromatograficznych, opisanych w literaturze, farmakopei i specyfikacji wybranych produktów leczniczych [1–4]. Porównywano sprawność zastosowanych układów chromatograficznych do rozdziatu poszczególnych zanieczyszczeń, opisanych w monografii glicemipirydu (Ph. Eur.: 2223) i oceniano ich zawartość w dwóch różnych produktach leczniczych.

Część eksperymentalna

Aparatura

Chromatograf cieczowy firmy Shimadzu, wyposażony w dwie pompy LC-10AT vp, kontroler SCL-10A vp połączony z komputerem (program Class-VP 5.03), automatyczny podajnik próbek SIL-10AD vp, detektor UV-VIS SPD-10A vp i piec dla kolumny CTO-10AC vp.

Materiały i odczynniki

W badaniach stosowano acetonitryl, tetrahydrofuran, heptan, 2-propanol (Lab-Scan), kwas trifluoroctowy, diwodorofosforan sodu, diwodorofosforan potasu (AppliChem) i wodę. Wszystkie odczynniki posiadały czystość wymaganą w metodzie HPLC.

Jako wzorce używano: wzorzec Glicemipiride CRS, farmakopealne wzorce zanieczyszczeń glicemipirydu (A, B, C, D).

Metody

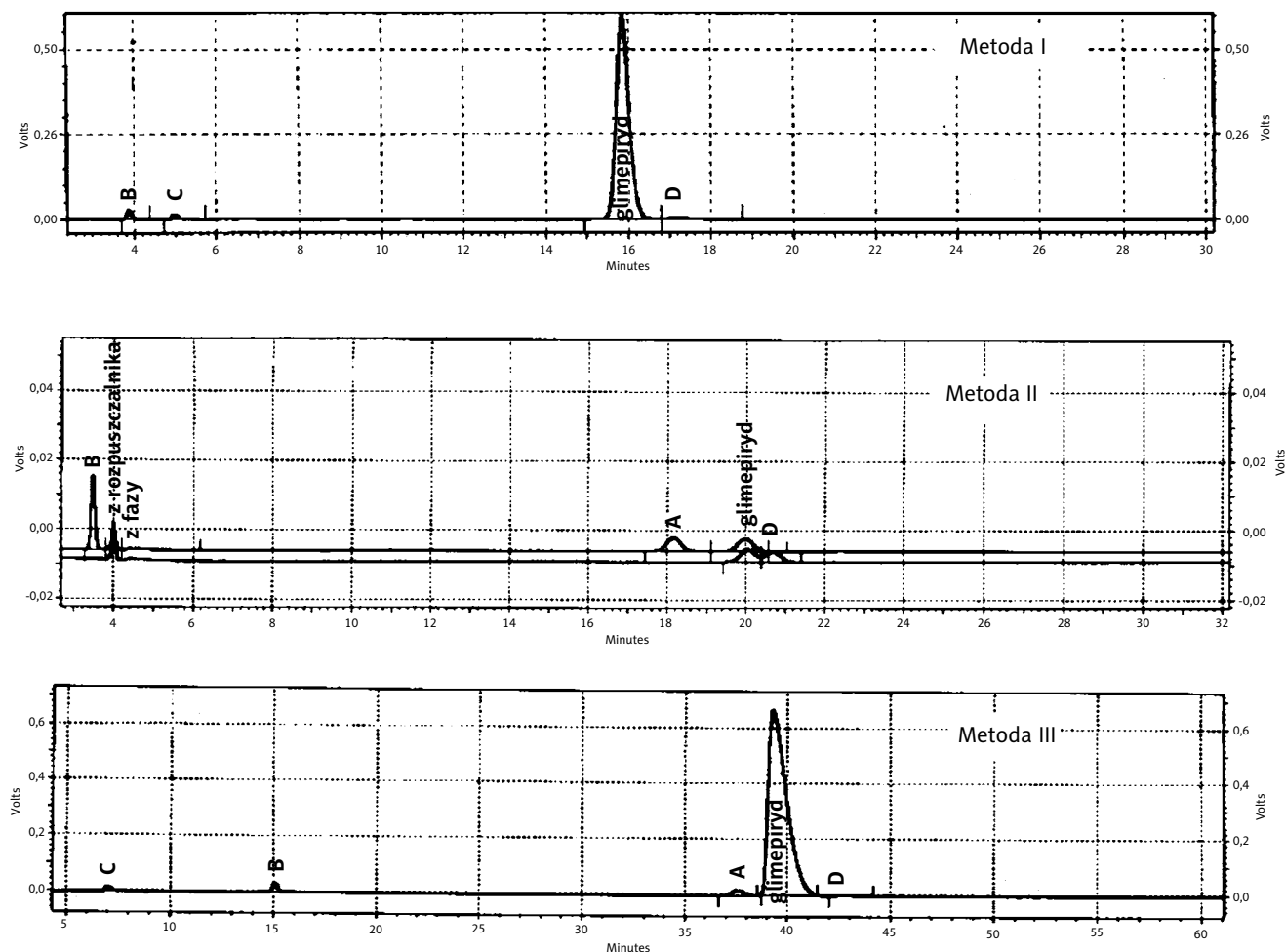
Do oznaczania zanieczyszczeń glicemipirydu w badanych preparatach wykorzystano cztery metody analityczne, różniące się warunkami chromatograficznymi [1–4]. Oznaczenia jakościowe i ilościowe prowadzono w warunkach chromatograficznych szczegółowo opisanych w **tabeli 1**.

Wyniki i omówienie wyników

W ostatnim czasie na rynku pojawiło się wiele odtwórczych doustnych produktów leczniczych stosowanych w terapii cukrzycy, w tym produkty zawierające glicemipiryd. Produkty tego typu przeznaczone

Odtwórcze produkty lecznicze, zgodnie z przyjętą definicją, powinny posiadać tę samą, co lek oryginalny jakość, skuteczność i bezpieczeństwo stosowania, czyli powinny być terapeutycznie ekwiwalentne, co pozwala na wymienną stosowania.

Produkt odtwórczy powinien zawierać tę samą substancję czynną, choć może ona pochodzić od innego wytwórcy i może zawierać inne substancje pomocnicze niż użyte w leku oryginalnym.



Rycina 1. Przykładowe chromatogramy uzyskane trzema metodami (tabela 1), dla próby modelowej zawierającej glicypiryd, wzbogaconej dodatkiem farmakopealnych zanieczyszczeń: cis-izomeru (A), sulfonamidu (B), karbaminianu (C) i meta-izomeru (D)

są do terapii przewlekłej, stąd obok skuteczności bardzo istotne zagadnienie stanowi bezpieczeństwo ich stosowania, na które składa się między innymi obecność zanieczyszczeń. Aspekt ten powinien być szeroko uwzględniany w badaniach rozwojowych prowadzonych dla poszczególnych produktów leczniczych. W niniejszej pracy odniesiono się do tego istotnego zagadnienia i podjęto próbę porównania jakości produktów odtwórczych w odniesieniu do zawartości zanieczyszczeń, z uwzględnieniem przydatności i specyficzności różnych metod wskazanych do oceny ich zawartości i wcześniej opisanych w piśmiennictwie [1–4].

Do oznaczania tożsamości i zawartości zanieczyszczeń glicypirydu w dwóch odtwórczych produktach diabetologicznych wykorzystano cztery metody HPLC, różniące się warunkami rozdziału,

szczegółowo opisanymi w tabeli 1. Sprawność poszczególnych układów chromatograficznych do rozdziału czterech farmakopealnych zanieczyszczeń glicypirydu oceniano dla próby modelowej zawierającej glicypiryd, wzbogaconej dodatkiem cis-izomeru (zanieczyszczenie A), sulfonamidu (zanieczyszczenie B), karbaminianu (zanieczyszczenie C) i meta-izomeru (zanieczyszczenie D), w ilości odpowiadającej dopuszczalnemu limitowi dla każdego z nich, przyjętemu w specyfikacji badanych produktów. Przykładowe chromatogramy otrzymane trzema metodami dla próby modelowej przedstawiono na rycinie 1. Z analizy uzyskanych

W Farmakopei Europejskiej rozróżnione są różne typy zanieczyszczeń. Wśród zanieczyszczeń wyróżniono „wyszczególnione” i tak zwane „inne”, rozumiane jako „każde inne, niż znane zanieczyszczenie” lub przyjmuje się bardziej ogólne wymaganie określone jako „jakiegokolwiek zanieczyszczenia”.

Każdy produkt leczniczy posiada własną dokumentację rejestracyjną, w której zawarte są wymagania jakościowe (specyfikacja) oraz kryteria oceny powiązane ze wskazanymi metodami analitycznymi. W konsekwencji do oceny określonych parametrów jakości, np. zawartości zanieczyszczeń, mogą być stosowane różne metody analityczne.

chromatogramów wynika, że zastosowane metody chromatograficzne umożliwiają w różnym zakresie rozdział glimepirydu od jego zanieczyszczeń. Zastosowane w metodzie I, a opisane w farmakopei i literaturze warunki rozdziału chromatograficznego, umożliwiają identyfikację trzech z czterech badanych zanieczyszczeń: sulfonamidu, karbaminianu i meta-izomeru [1, 3, 4]. Zdolność rozdzielcza (R_s) wyliczona pomiędzy pikem uzyskanym dla sulfonamidu i karbaminianu wynosiła 4,19, a pomiędzy pikem głównym i zanieczyszczeniem D (meta-izomer) $R_s=2,18$. Oznaczanie czwartego zanieczyszczenia cis-glimepirydu wymaga zastosowania innych warunków chromatograficznych, przedstawionych w metodzie IV. Metoda II pozwala na oznaczanie tylko zanieczyszczenia B (sulfonamid) i A (cis-izomer), w oznaczaniu karbaminianu (zanieczyszczenie C) zaobserwowano interferencję fazy ruchomej, a zanieczyszczenie D nie jest odpowiednio rozdzielone od piku głównego, tj. glimepirydu ($R_s=0,77$). Najlepsze rozdziały uzyskano w warunkach przyjętych w metodzie III, które umożliwiają równoczesne oznaczanie wszystkich czterech farmakopealnych zanieczyszczeń w jednym przebiegu. Uzyskano poprawne

rozdziały, wynoszące $R_s=1,22$ i $R_s=2,2$, odpowiednio pomiędzy zanieczyszczeniem A a pikiem głównym i pikiem głównym a zanieczyszczeniem D. W oparciu o uzyskane rozdziały dla próby modelowej (rycina 1) oceniono przydatność poszczególnych metod do oznaczania czterech farmakopealnych zanieczyszczeń glimepirydu. Najszerze spektrum oznaczania znanych zanieczyszczeń umożliwiają metoda III oraz metoda I uzupełniona metodą IV. Natomiast metoda II jest nieodpowiednia do oznaczania karbaminianu i meta-izomeru. Dopuszczalne limity zanieczyszczeń dla wybranych do badań produktów leczniczych zamieszczono w tabeli 2. Porównano, zatwierdzone w procesie rejestracji badanych produktów, wymagania dotyczące identyfikacji i przyjętych ilościowych limitów dla poszczególnych znanych i nieznanymi zanieczyszczeń. Z zamieszczonego w tabeli 2 zestawienia wynika, że przyjęte wymagania jakościowe dla badanych produktów są zróżnicowane, co do ilości i zawartości oznaczanych zanieczyszczeń i są powiązane z opisanymi dla danego produktu warunkami chromatograficznymi. W kolejnym etapie pracy, w dwóch wybranych produktach z glimepirydem wykonano, opisanymi powyżej metodami, oznaczanie zanieczyszczeń. Przedstawione w tabeli 3 wyniki dla zawartości znanych, nieznanymi i sumy zanieczyszczeń oznaczonych w badanych produktach leczniczych, mieszczą się w przedstawionych w tabeli 2 dopuszczalnych limitach, przyjętych dla tych produktów.

Tabela 2. Wymagania jakościowe, określające dopuszczalne limity zanieczyszczeń glimepirydu w badanych produktach leczniczych

Oznaczone zanieczyszczenia	Dopuszczalny limit	
	Produkt 1	Produkt 2
Zanieczyszczenie A (cis-izomer)	≤0,8%	≤0,4%
Zanieczyszczenie B (sulfonamid)	≤0,6%	≤0,4%
Zanieczyszczenie C (karbaminian)	≤0,1%	nie określono
Zanieczyszczenie D (meta-izomer)	≤0,1%	nie określono
Największe nieznanne zanieczyszczenie	≤0,1%	≤0,1%
Suma zanieczyszczeń (z wyłączeniem znanych)	≤0,5%	≤1,0%

Podsumowanie

1. Chromatograficzne metody analityczne stosowane do oznaczania zanieczyszczeń w produktach z glimepirydem nie są równorzędne, ponieważ różnią się liczbą oznaczanych zanieczyszczeń. Najbardziej przydatna do oznaczania zanieczyszczeń okazała się metoda trzecia, umożliwiająca w jednym przebiegu prawidłowe oznaczanie czterech farmakopealnych zanieczyszczeń glimepirydu. Dodatkowo, metoda ta jest mniej czasochłonna

Tabela 3. Zawartość zanieczyszczeń w badanych próbach, oznaczona w warunkach chromatograficznych opisanych w tabeli 1. Wynik LOD – limit detekcji, n. o. – metoda uniemożliwia oznaczanie danego zanieczyszczenia, * wynik uzyskany metodą IV

Metoda	Produkt	Oznaczona zawartość poszczególnych zanieczyszczeń w %				Największe nieznanne zanieczyszczenie	Suma zanieczyszczeń (z wyłączeniem znanych)
		A cis-izomer	B sulfonamid	C karbaminian	D meta-izomer		
I + IV	1	0,05%*	0,11%	0,03%	0,04%	0,03%	0,16%
	2	0,04%*	0,17%	<LOD	0,02%	0,01%	0,08%
II	1	0,02%	0,11%	n. o.	n. o.	0,03%	0,03%
	2	0,03%	0,14%	n. o.	n. o.	0,03%	0,10%
III	1	0,04%	0,22%	0,07%	0,06%	0,05%	0,31%
	2	0,04%	0,27%	<LOD	0,04%	0,07%	0,20%

i przez to tańsza od metody I, uzupełnionej metodą IV.

2. W oparciu o uzyskane wyniki oznaczania zawartości zanieczyszczeń w wybranych produktach odtwórczych zawierających glimepiryd, wykazano porównywalną jakość badanych produktów.

Otrzymano: 2009.06.24 · Zaakceptowano: 2009.07.10

Piśmiennictwo:

1. Kovarikova P., Klimes J., Dohnal J. and Tisovska L.: HPLC study of glimepiride under hydrolytic stress conditions. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004, 36, 205–209.
2. Khan A.K., Sinha S., Vartak S., Bhartiya A., Kumuar S.: LC determination of glimepiride and its related impurities. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005, 39, 928–943.
3. European Pharmacopea: glimepiride, 01/2008: 2223.
4. Pharmaeuropa. 2004, 16(3), 435–436.