

VYUŽITÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE PŘI STUDIU STABILITY A DEGRADACE FARMACEUTICKY VÝZNAMNÝCH LÁTEK

MICHAEL SKÁLA a TOMÁŠ KRÍŽEK

Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, Hlavova 2030/8, 128 00 Praha 2, Česká republika
skalamic@natur.cuni.cz

Klíčová slova: HPLC, radikál, radikálový scavenger, UV-Vis detekce, TEMPO, GSH, GSSG, askorbová kyselina, kumarin

• <https://doi.org/10.54779/ccsss20250010>

Úvod

Chemické radikály jsou jedním z nejfrekventovanějších témat moderního pojetí chemie. Tyto molekuly, typické přítomností nepárového elektronu ve valenční sféře, vytváří řadu otázek ve světě průmyslové chemie, chemických technologií i medicínských oborů. Jedním z odvětví, která se s volnými radikály potýkají, je farmaceutický průmysl. Přítomnost volných radikálů v léčivých přípravcích je nutno sledovat, protože může vést k degradaci účinné látky (API) a zkrácení doby trvanlivosti léčiva, často za vzniku neúčinných až toxických produktů. Volné radikály se do léčiva dostávají převážně z kontaminovaných přídatných látek (excipientů) – plnidel, barviv, sladidel atd. Chemická syntéza těchto složek probíhá často jako polymerizační reakce s použitím radikálů nebo radikálových činidel jako katalyzátorů. Ty i přes procesy přechištění zůstávají v excipientech a mohou se tak dostat až do léčiv samotných¹.

Ač se v přírodě jedná o molekuly různorodého tvaru a velikosti, jedna vlastnost je prakticky všem společná – reagují takřka se všemi látkami, jsou přítomné téměř všude a jejich stanovení je značně obtížné. Malé radikály disponují poločasem života v řádech nanosekund až mikrosekund, pro stanovení těchto radikálů je nejvhodnější analytickou metodou elektronová paramagnetická rezonance (EPR) a pro jejich zachycení jsou nutné speciální nitronové radikálové pasti. Jiné radikály přežívají déle, existují dokonce i radikály plně stabilní a separovatelné. Pro jejich stanovení se dají využít běžné laboratorní metody. Nejčastěji voleným postupem je eliminace radikálu pomocí radikálového scavengeru (lze přeložit z angličtiny jako „mrchožrout“), to jsou molekuly schopné zbavit radikál jeho typické radikálové struktury, a tedy i jeho typického radikálového chování tím, že přijmou nepárový elektron do své struktury nebo radikálu předají druhý elektron do

páru. Mezi radikálové scavengery lze zařadit i řadu v přírodě se vyskytujících látek – redukovaný glutathion, askorbovou kyselinu (vitamin C), α -tokoferol (vitamin E), kumarinové deriváty, β -karoten aj.²

Ve své práci se snažím nalézt vhodný radikálový scavenger a vyvinout metodu, jež by umožňovala pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV-Vis spektrometrickým detektorem univerzální kvantifikaci radikálů obsažených ve farmaceutických excipientech, což by napomohlo používání chemicky čistších excipientů při výrobě, a tím pádem i prodloužení doby trvanlivosti léčiv. S tím jde ruku v ruce snížení množství farmaceuticky aktivního odpadu. V případě úspěšného vývoje metody budou provedeny kvantifikace radikálů v různých farmaceutických excipientech a bude provedeno srovnání hodnot. Práce rovněž povede k lepší charakterizaci reakcí radikálových scavengerů s radikály, převážně s radikálem TEMPO, který je používán jako modelový radikál.

Experimentální část

Chromatograf

Pro separaci byl využíván kapalinový chromatograf od společnosti Agilent Technologies (USA) s pumpou a kolonovým oddílem série 1260 Infinity. Detektorový oddíl s diodovým polem a injektorový oddíl byly staršího typu 1200. Analýzy byly prováděny na koloně série Kinetex C₁₈ (Phenomenex, USA) obsahující částice technologie core-shell o velikosti 2,6 μ m s velikostí pórů 100 Å. Délka chromatografické kolony byla 100 mm s vnitřním průměrem 2,1 mm.

Pro experimenty s hmotnostní detekcí byl za stejných chromatografických podmínek použit chromatograf Vanquish s MS Orbitrap Exploris 120 od výrobce Thermo Fisher Scientific (USA).

Další vybavení

Analytické váhy Precisa 262 SMA-FR (Precisa, Švýcarsko); automatické pipety Socorex série Acura 825 (Socorex Isba, Švýcarsko); systém čištění vody pro HPLC Millipore Milli-Q (Merck Millipore, USA).

Chemikálie

Acetonitril HPLC kvality (VWR International, USA); trifluoroctová kyselina p.a.; stabilní radikál TEMPO 99 %; L-glutathion redukovaný p.a.; L-glutathion oxidovaný p.a.; kumarin p.a. (vše Sigma-Aldrich, Německo); askorbová kyselina p.a. (Lach-Ner, Česká republika).

Výsledky a diskuse

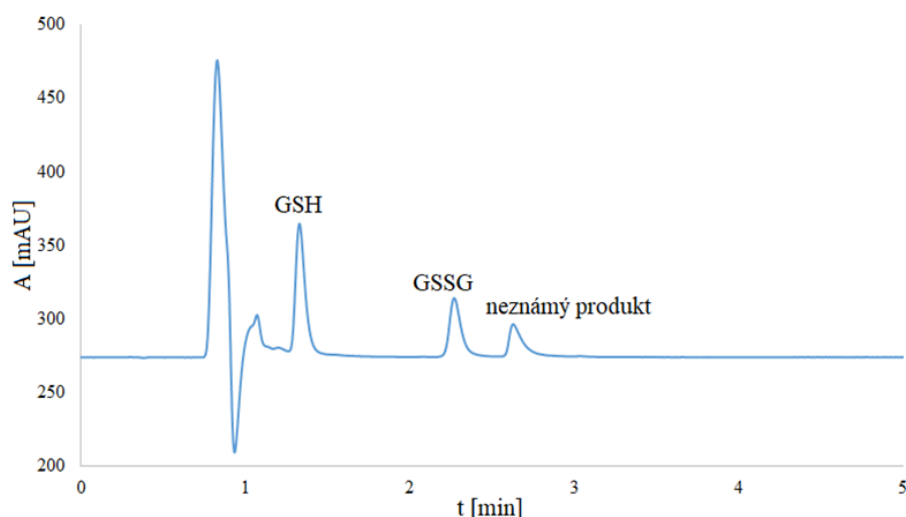
Pro vývoj metody byl jako radikálový standard zvolen radikál TEMPO. Jedná se o červenou krystalickou látku plně stabilní v radikálové formě, zároveň je to látka velmi dobře dostupná.

Jako první testovaný radikálový scavenger byl zvolen redukovaný L-glutathion (GSH). Jedná se o jeden z nejznámějších buněčných antioxidantů, který přispívá k eliminaci radikálů i na buněčné úrovni jednoduchým mechanismem předání vodíku za vzniku oxidované formy (GSSG). Otázkou bylo, jakým způsobem bude reakce probíhat *in vitro* bez přítomnosti příslušných enzymů.

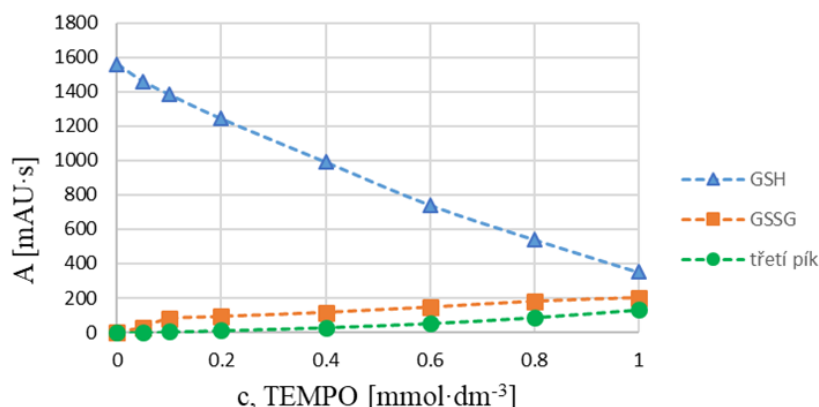
Nejprve bylo třeba optimalizovat metodu separace GSH a GSSG. Jedná se o vysoce polární analyty, které vykazují nízkou afinitu k nepolárním stacionárním fázím. Prvotní obtíže se zadržením GSH a GSSG na RP-HPLC vyřešil přidavek iontové párové činidla, trifluoroctové

kyseliny (TFA), do mobilní fáze. Koncentrace TFA byla zvolena jako 0,1 % (pH = 2), objemový poměr tohoto roztoku a acetonitrilu byl 98:2. V takové směsi jsou oba peptidy kladně nabitě a dochází tak k vhodnému iontovému párování s TFA. Detekce byla prováděna při 215 nm, kde absorbují peptidové vazby glutathionu.

Při předpokládaném mechanismu reakce přenosem vodíku by jedna molekula GSH byla schopna eliminovat jednu molekulu radikálu TEMPO. Při stejné molární koncentraci by tedy po dosažení ustáleného stavu nemělo být GSH ani TEMPO detekovatelné. Jak se ukázalo, reakce probíhá takřka okamžitě, radikál TEMPO je při reakci spotřebován a není detekovatelný při 215 nm ani ve svém absorpčním maximu 445 nm, nicméně k poklesu koncentrace GSH dochází přibližně ze 75 % a nárůst koncentrace GSSG je minimální. K tomu je na spektru při 215 nm detekovatelný třetí pík některého z vedlejších produktů objevujícího se při vyšších koncentracích radikálu (obr. 1).



Obr. 1. Chromatogram produktů reakce 1mM GSH a 1mM TEMPO



Obr. 2. Vznikající množství produktů a zanikající množství GSH v závislosti na koncentraci radikálu TEMPO

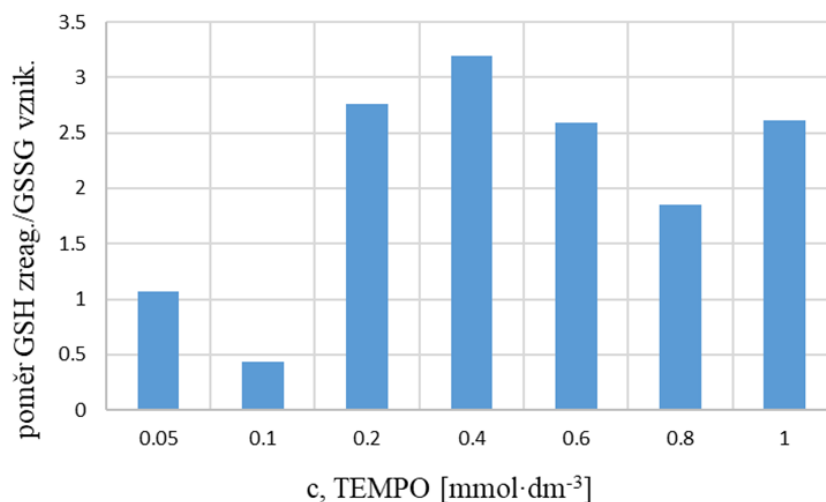
Je tedy zřejmé, že reakce neprobíhá pouze mechanismem přenosu vodíku, ale z větší části se uplatňuje mechanismus jiný. Druhou možností je, že TEMPO reaguje i s jinými složkami roztoku, nejenom s GSH (cit.³). Plochy píků produktů reakce naměřené po třiceti minutách reakce 1mM GSH s postupně narůstající koncentrací TEMPO jsou znázorněny na obr. 2. Je vidět, že při vyšších koncentracích radikálu vzniká menší množství GSSG a dochází k intenzivnějšímu nárůstu třetího píku. S vzrůstající koncentrací radikálu logicky klesá koncentrace výchozího GSH, s ní ale neroste koncentrace vzniklého GSSG tak rapidně, jak znázorňuje sloupcový diagram poměru zreagovaného GSH a vzniklého GSSG (obr. 3).

Po logické úvaze následovala MS analýza produktů reakce. Třetí pik pozorovaný na HPLC-UV-Vis chromatogramu byl pravděpodobně fragment GSH vznikající při jednom z vedlejších mechanismů reakce a došlo u něj k lepšímu zadržení z důvodu přítomnosti dvojné vazby (142 *m/z*, viz cit.⁴). Z látek elujících v blízkosti času eluce TEMPO lze pozorovat nárůst intenzity pro 158 *m/z* – tedy

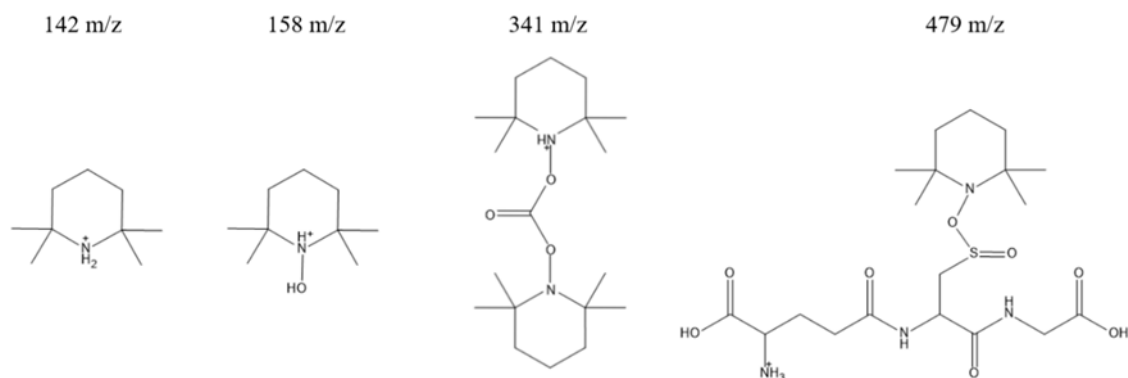
pro námi předpokládaný produkt přenosu vodíku za vzniku TEMPOH – a pro další dva významné píky aduktů TEMPO s GSH u 479 *m/z* a 341 *m/z*. Dále pak lze pozorovat celkový nárůst intenzity pro 142 *m/z* (protonovaný 2,2,6,6-tetramethylpiperidin), odhadované struktury produktů jsou zobrazeny na obr. 4. Oxidace redukované formy glutathionu je tedy dobrým indikátorem přítomnosti radikálů, nicméně lze ji použít pouze k řádovému odhadu koncentrace. Přesná kvantifikace radikálů je problematická z důvodu nelineárního vzniku oxidované formy a velkého množství možných vedlejších produktů radikálové reakce s peptidem, proto bylo od jeho použití ve vývoji metody upuštěno.

Dalším testovaným radikálovým scavengerem byl kumarin, který nereagoval s radikálem vůbec, jedná se pravděpodobně pouze o scavenger hydroxylových radikálů.

V současnosti probíhá testování askorbové kyseliny jako radikálového scavengeru. Jedná se o další látku hojně se vyskytující na buněčné úrovni, a to v relativně vysokých koncentracích. Obtíží je zatím podobnost výchozí



Obr. 3. Poměry zreagovaného GSH a vzniklého GSSG v závislosti na koncentraci radikálu TEMPO



Obr. 4. Předpokládané struktury produktů scavengerové reakce TEMPO a GSH

látky a produktu – askorbové, resp. dehydroaskorbové kyseliny. Obě látky eluují ve stejném čase zatím při všech vyzkoušených podmínkách, čili cílem v blízké době je jejich dostatečná chromatografická separace a následné vytvoření kalibrační závislosti odezvy vzniklého produktu na koncentraci radikálu.

Závěr

Charakterizace reakcí radikálových scavengerů s volnými radikály je stále žhavým tématem moderní doby. Další součástí mé práce bude charakterizace reakce askorbové kyseliny s radikálovým standardem, dále snaha porozumět mechanismu a pokusit se charakterizovat produkty reakce s takto významným biologickým antioxidantem.

LITERATURA

1. Wu Y., Levons J., Narang A. S., Raghavan K., Rao V. M.: AAPS PharmSciTech 12, 1248 (2011).
2. Polterait O.: Curr. Org. Chem. 1, 415 (1997).
3. Ma Y., Loyns C., Price P., Chechik V.: Org. Biomol. Chem. 9, 5573 (2011).
4. Alanazi A. M., Mostafa G. A., Al-Badr A. A., v knize: *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, Vol. 40 (Brittain H. G., ed.), kap. 2, str. 43. Academic Press, London 2015.

M. Skála and T. Křížek (*Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Prague, Czech Republic*): **Application of Liquid Chromatography in the Study of Stability and Degradation of Pharmaceutically Important Materials**

Nowadays, the determination of free radicals has become one of the main goals in chemical industry, especially in pharmaceuticals, because of the reactivity of radicals and thus the formation of impurities and possibly inactive or toxic products resulting from reactions with active pharmaceutical ingredients. This work focuses on the determination of radicals contained in pharmaceutical excipients using high-performance liquid chromatography on reverse phase (RP-HPLC). As a desired result, we are looking for a radical scavenger that is able to undergo a defined reaction with the radical and linearly produce a quantifiable product. The stable radical molecule (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl (TEMPO) is used as a standard of radical behavior. Firstly, the purity of the radical was verified for possible impurities by MS analysis, which showed a high purity of TEMPO. Secondly, the efficiency of several well-known scavengers was tested by reaction with TEMPO. While the reduced glutathione showed a very fast reaction with the radical, the predicted product (in this case oxidized glutathione) did not form linearly, and the subsequently performed MS analysis showed multiple reaction pathways, mostly explained by breakage of the peptide chain. Coumarin was used next in order, which showed no determinable reaction with the radical at all, even after increasing the temperature. At present, the main attention is focused on ascorbic acid and its oxidation product dehydroascorbic acid. We expect the scavenging mechanism to be very similar to that of reduced glutathione, however, the possibilities of side products are limited, the main issue at this point being the RP-HPLC separation of ascorbic and dehydroascorbic acid, respectively.

Keywords: HPLC, radical, radical scavenger, UV-Vis detection, TEMPO, GSH, GSSG, ascorbic acid, coumarin



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoli média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.