

## ORIGINAL ARTICLE

# Stanovenie vareniklínu v lieku Champix® dvojdimenzionálnou kapilárnou elektroforézou v spojení s UV detekciou

## Determination of varenicline in the preparation Champix® with the use of two-dimensional capillary electrophoresis in connection with UV detection

Juraj Piešťanský • Katarína Maráková • Lucia Veizerová • Jaroslav Galba • Peter Mikuš

Došlo 15. októbra 2013 / Prijato 30. októbra 2013

### Súhrn

Práca sa zaoberá vývojom analytickej metódy na báze dvojdimenzionálnej kapilárnej elektroforézy (spojenie CITP-CZE) s jednoduchou UV-detekciou pre stanovenie vysokoúčinného farmaka – vareniklínu s možnosťou spojenia vypracovanej metódy s pokročilou detekčnou koncovkou – hmotnostným spektrometrom. Na základe takto koncipovaných požiadaviek boli zvolené optimálne elektrolytové systémy pre CITP (LE = 10 mM NH<sub>4</sub>Ac + 5 mM HAc + 0,05% m-HEC; TE = 10 mM HAc) a CZE (BGE = 20 mM HAc) separáciu vareniklínu. Detekcia bola uskutočnená pri vlnovej dĺžke 237 nm. Uvedené spojenie umožnilo rýchle a efektívne hodnotenie vareniklínu v jeho tabletovej liekovej forme s medzou dôkazu (LOD) na úrovni 5,92 ng/ml.

**Kľúčové slová:** nikotín • vareniklín • dvojdimenzionálna kapilárna elektroforéza • liekové formy • farmácia

### Summary

This paper deals with an analytical method based on two dimensional capillary electrophoresis (CITP-CZE coupling) with simple UV-detection for the determination of a highly effective drug – varenicline. The method was elaborated with the possibility of its future connection with an advanced detection ending – mass spectrometry. The electrolytes for the CITP (LE = 10 mM NH<sub>4</sub>Ac + 5 mM HAc + 0,05% m-HEC; TE = 10 mM HAc) and

CZE (BGE = 20 mM HAc) separation of varenicline were selected considering such requirements. The UV detector was set at the constant wavelength of 237 nm. The presented CITP-CZE-UV combination enabled rapid and effective evaluation of varenicline in the dosage forms with LOD 5.92 ng/ml.

**Keywords:** nicotine • varenicline • two dimensional capillary electrophoresis • dosage forms • pharmacy

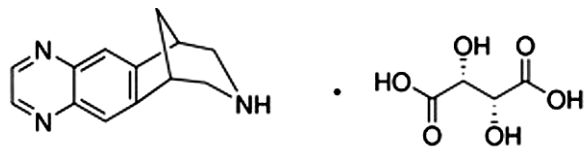
### Úvod

Vstup tabaku do civilizovaného sveta koncom 15. storočia znamenal i vzostup kultúry fajčenia. Fajčenie tabaku sa stalo spoločnosťou akceptovanou závislosťou a v súčasnosti patrí medzi jeden z hlavných predispozičných faktorov, ktoré výrazne zhoršujú zdravie obyvateľstva a sú zodpovedné za jeho zvýšenú morbiditu a mortalitu, a to najmä z hľadiska ochorení ako sú rakovina pľúc, chronická bronchitída alebo ischemická choroba srdca<sup>1</sup>. Hlavnou obsahovou látkou v tabaku, ktorá zodpovedá za jeho účinky je nikotín – alkaloid odvodený od kyseliny nikotínovej<sup>2</sup>. V organizme sa viaže na nikotínové receptory, a tak sa zúčastňuje cholinergnej transmisie. V nízkych dávkach pôsobí nikotín stimulačne, vo vyšších vyvoláva útlm parasympatického nervstva. Na nikotín vzniká psychická i fyzická závislosť<sup>3</sup>.

Odvyskanie od fajčenia a liečba nikotínovej závislosti je veľmi náročný proces a veľa fajčiarov svoj cieľ nenaplní. Je možné ju uskutočniť aj farmakologicky. V praxi uplatnenie našla náhradná nikotínová terapia, kedy sa nikotín v odstupňovaných dávkach aplikuje vo forme liečivej žuvačky, pastilky alebo náplasti. Liečivo amfebutamón (bupropion) s antidepresívnym účinkom zvyšuje schopnosť pacientov abstinovať. Mechanizmus tohto účinku nie je známy, ale predpokladá sa zásah do dopaminergnej transmisie v mezolimbickom systéme<sup>4</sup>. V prípade liečby nikotínovej závislosti sa uvažuje

PharmDr. Juraj Piešťanský (✉) • K. Maráková • L. Veizerová • J. Galba • P. Mikuš  
Katedra farmaceutickej analýzy a nukleárnej farmácie FaF UK  
Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, Slovenská republika  
e-mail: piestansky@fpharm.uniba.sk

i o použití tricyklického antidepresíva nortriptilínu alebo centrálneho antihypertenzíva klonidínu<sup>5)</sup>. Perspektívu vo farmakoterapii nikotínovej závislosti predstavuje i liečivo vyvinuté cielene pre tento účel – vareniklín.



Obr. 1. Chemická štruktúra vareniklín tartarátu<sup>6)</sup>

Liečivo vareniklín je odvodené od alkaloidu cytizínu<sup>7)</sup> získavaného z *Cytisus laburnum* L. (*Fabaceae*), ktorý pôsobí ako agonista na nikotínových cholinergných receptoroch. Vareniklín (8,9,10-tetrahydro-6,10-metano-6H-pyrazino[2,3-h][3]benzazepín) vo forme soli s tartarátom (obr.1) bol schválený pre terapiu nikotínovej závislosti a v roku 2006 registrovaný americkou FDA pod ochranným názvom *Chantix*, v Európe bol registrovaný úradom EMA pod ochranným názvom *Champix*<sup>8)</sup>. Vareniklín pôsobí ako parciálny agonista  $\alpha 4\beta 2$  nikotínových acetylcholinových receptorov situovaných vo ventrálnej tegmentálnej oblasti mozgu. Obsadenie  $\alpha 4\beta 2$  receptorov spôsobí ich čiastočnú aktiváciu a spúšťa sled biochemických procesov, ktoré vedú k čiastočnej stimulácii dopaminergnej transmisie v mezolimbickom systéme. Samotnému dopamínu a dopaminergnej transmisii v tejto časti mozgu je prisudzovaná hlavná úloha a zodpovednosť za určitý pocit odmeny, blaha a slasti u fajčiara po vyfajčení cigarety<sup>9)</sup>.

S vareniklínom ako vysokoúčinným liečivom je spojené i riziko vzniku závažných nežiaducich účinkov, ktoré sú charakterizované zmenami v správaní a/alebo myslení, depresiami, agresívnym správaním, nestabilitou nálady, suicídnyimi myšlienkami a dokonca i pokusmi o samovraždu. Z tohto dôvodu je potrebné dôkladné sledovanie pacientov v priebehu ich odvykacej liečby. V takýchto prípadoch sa nápomocnými na klinických pracoviskách stávajú separačné analytické metódy umožňujúce rýchle monitorovanie hladín liečiv v biologických tekutinách. Okrem biomedicínskej aplikácie je možné dané analytické metódy implementovať i do prostredia samotnej výroby a prípravy liečiv a liekov, kde efektívny proces separácie v kombinácii s vhodnou detekčnou technikou prispieva k zabezpečeniu ich najvyššej akosti. Dominantnými sa vo farmaceutickej oblasti stali chromatografické metódy, a to na základe ich jednoduchosti a kváziuniversalnosti. Podnetnými a v súčasnosti stále viac sa rozvíjajúcimi sú elektromigračné metódy v kapilárnom prevedení – najmä kapilárna elektroforéza (CE), ktorá sa v spojení s vysokocitlivými a selektívnymi detekčnými technikami môže stať alternatívou k bežným konvenčným chromatografickým systémom.

Na hodnotenie liečiva vareniklínu a jeho nečistôt v liekovej forme tabliet boli použité viaceré analytické metódy, predovšetkým však chromatografické<sup>10–16)</sup>. Technikami HPLC a RP-HPLC v spojení s UV-detekciou boli dosiahnuté medze dôkazu (LOD) na úrovni 0,003  $\mu\text{g/ml}$ <sup>11)</sup>; 0,11  $\mu\text{g/ml}$ <sup>12)</sup>; resp. 0,31  $\mu\text{g/ml}$ <sup>13)</sup>. LC

v spojení s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (MS/MS) bola zase použitá pre stanovenie vareniklínu v ľudskej plazme a liekovej forme, pričom vypracovaná metóda poskytovala LOD 6,0  $\text{ng/ml}$ <sup>15)</sup>. Rovnaké spojenie bolo použité i pri bioekvivalenčnej štúdií dvoch komerčných prípravkov s obsahom vareniklínu v krvnej plazme<sup>16)</sup>. Popísané bolo i spojenie CE s DAD detekciou pre stanovenie obsahu vareniklínu v tabletách, pričom medza dôkazu sa pohybovala na úrovni 0,2  $\mu\text{g/ml}$ <sup>17)</sup>. Aleksic a kol.<sup>18)</sup> použili voltametrické techniky pre stanovenie vareniklínu v roztokoch a vzorkách plazmy.

Z uvedených faktov z odbornej literatúry vyplýva, že okrem jedného prípadu<sup>11)</sup> doteraz nebola prezentovaná taká analytická metóda, ktorou by bez použitia vysokocitlivej detekčnej techniky bolo možné dosiahnuť mimoriadne nízke (jednotky  $\text{ng/ml}$  a nižšie) LOD pre vareniklín. Perspektívnou sa v tomto ohľade stáva dvojdimenzionálna (2D) CE kombinujúca v sebe techniky kapilárnej izotachoforézy (CITP) a kapilárnej zónovej elektroforézy (CZE). Použitie CITP ako predseparačnej techniky umožňuje zvýšenie dávkovaného množstva do elektroforetického analyzátoru až na 30  $\mu\text{l}$ , odstránenie nežiaducich makrokomponentov matrice a z toho vyplývajúce prečistenie a predúpravu vzorky. CZE v ďalšom kroku plní vlastnú analytickú úlohu s prepojením na vhodnú detekčnú koncovku. Takéto 2D usporiadanie umožňuje niekoľkonásobné zníženie medze dôkazu, a to už pri použití jednoduchej UV detekcie v porovnaní s CZE v jednokolónovom usporiadaní. Navyiac významne zvyšuje separačné možnosti (separačnú selektivitu) v porovnaní s jednokolónovou ITP<sup>19)</sup>. Preto cieľom našej práce bolo vyvinúť CITP-CZE metódu pre ultrastopové stanovenie vareniklínu. Z dôvodu zvýšenia aplikačného potenciálu navrhutej metódy bolo vybrané kritérium jej kompatibility nielen s UV absorpčnými detektormi, ale aj s detektormi na báze hmotnostnej spektrometrie, ktoré vďaka ich priamej identifikačnej schopnosti patria ku kľúčovým detekčným systémom súčasnosti. Toto kritérium bolo zohľadnené pri optimalizácii separačných podmienok pre CITP-CZE.

## Pokusná časť

### Inštrumentácia

Na prevedenie experimentálnej práce bol použitý elektroforetický analyzátor EA 102 (Villa Labeco, Spišská Nová Ves, Slovensko) v dvojkolónovom usporiadaní umožňujúcom CITP-CZE analýzu. CITP separačnú jednotku tvorila polytetrafluóretylénová kapilára s vnútorným priemerom 800  $\mu\text{m}$  a dĺžkou 90 mm umiestnená v bloku so zabudovaným vodivostným detektorom. CZE separačná jednotka pozostávala z polytetrafluóretylénovej kapiláry s vnútorným priemerom 300  $\mu\text{m}$  a dĺžkou 90 mm umiestnenej v bloku so zabudovaným vodivostným detektorom a UV koncovkou. Vzorka bola do analyzátoru dávkovaná prostredníctvom dávkovacieho bloku so zabudovanou 30  $\mu\text{l}$  vnútornou slučkou.

K analyzátoru bol prostredníctvom UV koncovky CZE bloku a optických vlákien (J & M, Aalen, Nemecko) pripojený UV detektor (ECOM, Praha, Česká republika), ktorý bol nastavený na konštantnú vlnovú dĺžku

(237 nm) zodpovedajúcu absorpčnému maximu analyzovanej látky. Údaje získavané z analyzátoru boli zaznamenávané a vyhodnocované prostredníctvom softvérového programu Aces (Prírodovedecká fakulta UK, Bratislava, Slovensko).

### Chemikálie a vzorky

Na prípravu roztokov elektrolytových systémov, ktoré boli volené tak, aby boli kompatibilné súčasne i s MS detekciou, sa použili octan amónny ( $\text{NH}_4\text{Ac}$ ), mravčan amónny ( $\text{NH}_4\text{Fo}$ ), kyselina octová (HAc) a kyselina mravčia (HFo) (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemecko). Všetky uvedené chemikálie mali požadovanú p.a. analytickú čistotu. Elektrolytové systémy boli pripravené rozpustením uvedených chemikálií v demineralizovanej vode pripravenej pomocou deionizačného systému Millipore Simplicity 185 (Lambda Life, Bratislava, Slovensko). Roztoky elektrolytov boli pred ich použitím filtrované membránovými filtrami s veľkosťou pórov 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore, Molsheim, Francúzsko). Referenčný štandard vareniklín tartarát s deklarovanou čistotou  $\geq 98\%$  bol získaný z firmy Sigma Aldrich (Steinheim, Nemecko). V prípade CITP separačného kroku bola do vodiaceho elektrolytu (LE) pridávaná metyl-hydroxyetylcelulóza (m-HEC) s koncentráciou 0,05% (w/v) (Fluka, Buchs, Švajčiarsko). Lieková forma (tablety Champix®) s obsahom vareniklínu (výrobcom deklarovaný obsah 1 mg v jednej tablete) bola získaná z miestnej lekárne.

### Príprava roztokov štandardov a vzoriek

Základný roztok štandardu vareniklínu sme pripravili rozpustením 5 mg štandardu v 10 ml demineralizovanej vody. Pracovné roztoky štandardov o požadovanej koncentrácii (koncentračný rozsah 20–500 ng/ml) sme pripravili riedením základného roztoku štandardu demineralizovanou vodou.

Pri príprave vzorky liekovej formy sme jednotlivo odvážili hmotnosť piatich tabliet lieku Champix® a následne sme vypočítali priemernú hmotnosť jednej tablety (0,2092 g). Odvážené tablety sme rozpráškovali v trecej miske. Z takto homogenizovanej vzorky sme do 100 ml odmernej banky navážili hmotnosť zodpovedajúcu priemernej hmotnosti jednej tablety lieku Champix®, ktorú sme doplnili po rýsku demineralizovanou vodou a 10 minút mechanicky pretrepávali. Roztok vzorky sme potom počas 20 minút nechali v ultrazvukovom kúpeli, následne sme takto upravený roztok riedili demineralizovanou vodou tak, aby koncentrácia analytu zodpovedala úrovni 100 ng/ml a pred analýzou filtrovali membránovými filtrami s veľkosťou pórov 0,45  $\mu\text{m}$ .

### Príprava vzoriek pre hodnotenie výťažnosti

Pre hodnotenie výťažnosti sme do roztoku reálnej matrice so zodpovedajúcou koncentráciou analytu 100 ng/ml pridávali štandardný prídavok vareniklínu. Pripravili sme tri vzorky s koncentraciami pridaného roztoku štandardu vareniklínu na úrovni 20, 100 a 500 ng/ml a jednu vzorku bez prídavku štandardu. Všetky vzorky boli následne

Tab. 1. Prehľad testovaných elektrolytových systémov pre separáciu vareniklínu

CITP			CZE		
LE	5 mM $\text{NH}_4\text{Ac}$ + 5 mM HAc	TE	5 mM HAc	BGE	10 mM HAc
	10 mM $\text{NH}_4\text{Ac}$ + 5 mM HAc				20 mM HAc
	10 mM $\text{NH}_4\text{Ac}$ + 10 mM HAc				25 mM HAc
	5 mM $\text{NH}_4\text{Fo}$ + 5 mM HFo		5 mM HFo		10 mM HFo
	10 mM $\text{NH}_4\text{Fo}$ + 5 mM HFo				20 mM HFo
	10 mM $\text{NH}_4\text{Fo}$ + 10 mM HFo				25 mM HFo

CITP – kapilárna izotachoforéza, CZE – kapilárna zónova elektroforéza, LE – vodiaci elektrolyt, TE – zakončujúci elektrolyt, BGE – základný (nosný) elektrolyt

mechanicky pretrepávané počas 10 minút a pred vlastnou analýzou filtrované cez membránové filtre s veľkosťou pórov 0,45  $\mu\text{m}$ .

### Výsledky a diskusia

#### Optimalizácia separačných podmienok pre CITP-CZE experiment

Optimalizácia separačných podmienok v sebe zahŕňa voľbu elektrolytových systémov pre CITP a CZE a súčasne i nastavenie hodnôt vodiaceho prúdu pre jednotlivé kroky. Zloženie elektrolytov a veľkosť aplikovaných prúdov sú volené zo zreteľom na rýchlosť a účinnosť analýzy, minimalizáciu tepelných a elektromigračných disperzných procesov a kompatibilitu spájaných techník. Z pohľadu elektroforetickej separácie sme tak museli brať do úvahy vlastnosti jednotlivých kombinovaných techník (CITP, CZE), pričom optimalizácia separačných podmienok zohľadňovala i možnosť použitia CITP-CZE metódy v spojení s hmotnostnou detekciou (MS). V takomto prípade musela byť splnená podmienka prchavosti elektrolytových systémov. V našej práci sme testovali nasledovné elektrolytové systémy, ktorých zloženie je zhrnuté v tabuľke 1.

Z uvedených testovaných elektrolytových systémov sa ako optimálny ukázal CITP-CZE systém s nasledovným zložením: a) LE = 10 mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$  + 5 mM HAc (pH 4,9), b) TE = 10 mM HAc (pH 3,1) a c) BGE = 20 mM HAc (pH 2,8). Súčasťou zvoleného vodiaceho elektrolytu bola i 0,05% m-HEC, ktorá zabezpečovala dynamické pokrytie CITP separačnej kapiláry, čím sa bránilo adhézii analytu na jej povrch a zároveň slúžila ako supresor elektroosmotického toku (EOF). Pre separáciu vareniklínu v CITP kroku sa ukázal byť vhodný vodiaci prúd 300  $\mu\text{A}$ , v CZE kroku 40  $\mu\text{A}$ . Takto zvolené separačné podmienky viedli k úspešnej separácii analytu z matric testovaných vzoriek, a to s dostatočnou účinnosťou ( $N$ ) v relatívne krátkom čase (viď *Validácia metódy*).

#### Validácia metódy

Validácia analytickej metódy predstavuje proces jej overovania, pri ktorom sa zisťuje vhodnosť zvolenej metódy pre daný zamýšľaný účel. Nami navrhnutú a optimalizovanú CITP-CZE metódu sme validovali na základe odporúčaní ICH smernice<sup>20</sup>. Hodnotené boli nasledovné parametre: linearita; presnosť (vyjadrená ako opakovateľnosť); medza dôkazu (LOD); medza stanovenia (LOQ); robustnosť; správnosť. Niektoré z uvedených validačných parametrov sú obsahom tabuľky 2.

Tab. 2. Vybrané operačné a validačné parametre CITP-CZE metódy

Parameter	CITP-CZE
t (min)	9,76
RSD <sub>tm</sub> (%), n = 6	0,31
RSD <sub>plocha</sub> (%), n = 6	4,32
r <sup>2</sup>	0,9989
LOD (ng/ml)	5,92
LOQ (ng/ml)	10,33
N	74035
výťažnosť (%)	95,7–102,75

Linearita navrhutej CITP-CZE metódy bola hodnotená meraním piatich rôznych koncentrácií roztoku štandardu vareniklínu, a to v rozmedzí 20–500 ng/ml (obr. 2a). Každá z piatich vzoriek bola premeraná 6-krát, pričom s použitím nameraných výsledkov bola zostrojená kalibračná krivka vyjadrujúca závislosť plochy analytického signálu od koncentrácie  $\{AU=f(c)\}$ . Parametre kalibračnej krivky boli hodnotené s použitím softvérového programu Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Rovnica kalibračnej krivky bola  $y = 26,39x - 56,219$ , pričom hodnoty korelačného koeficientu ( $r$ ) a koeficientu stanovenia ( $r^2$ ) hovoria o dobrej linearite kalibračnej krivky v zvolenom koncentračnom rozmedzí.

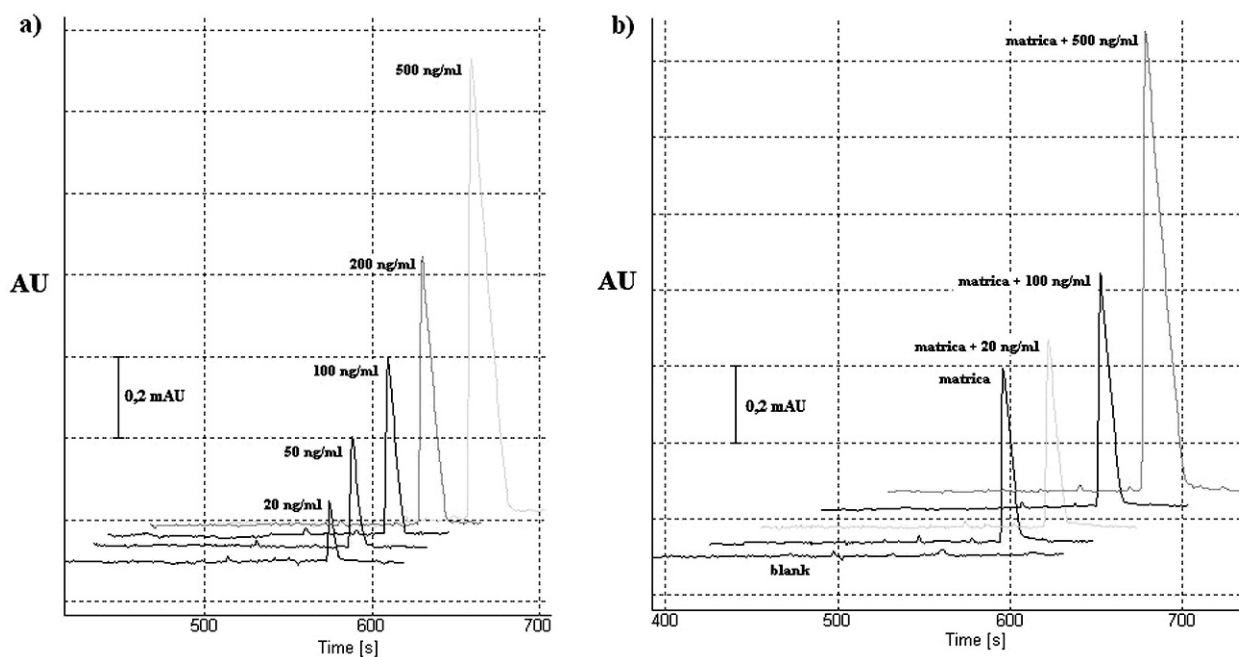
Medza dôkazu (LOD) ako najnižšia koncentrácia analyzovanej látky, ktorá je pri danej hladine spoľahlivosti ešte detegovateľná a medza stanovenia (LOQ) ako najnižšia koncentrácia analytu stanoviteľná s prijateľnou hodnotou presnosti boli vypočítané na základe stanovenia signálu slepej vzorky (demineralizovaná voda) pre desať meraní ( $n = 10$ ). Z uvedených meraní bol určený

priemerný signál slepej vzorky ( $x_0$ ) a jeho smerodajná odchýlka ( $s$ ), ktoré boli použité pri získaní veľkosti signálu detektora pre LOD  $\{y(D)\}$  a LOQ  $\{y(Q)\}$  na základe vzťahov:  $y(D) = x_0 + 3.s$ , resp.  $y(Q) = x_0 + 10.s$ . LOD a LOQ boli následne vypočítané z kalibračnej krivky. LOD na úrovni 5,92 ng/ml je približne na úrovni LOD, ktorý bol dosiahnutý s použitím HPLC v spojení s tandemovou hmotnostnou spektrometriou ako detekčnou koncovkou<sup>15</sup>.

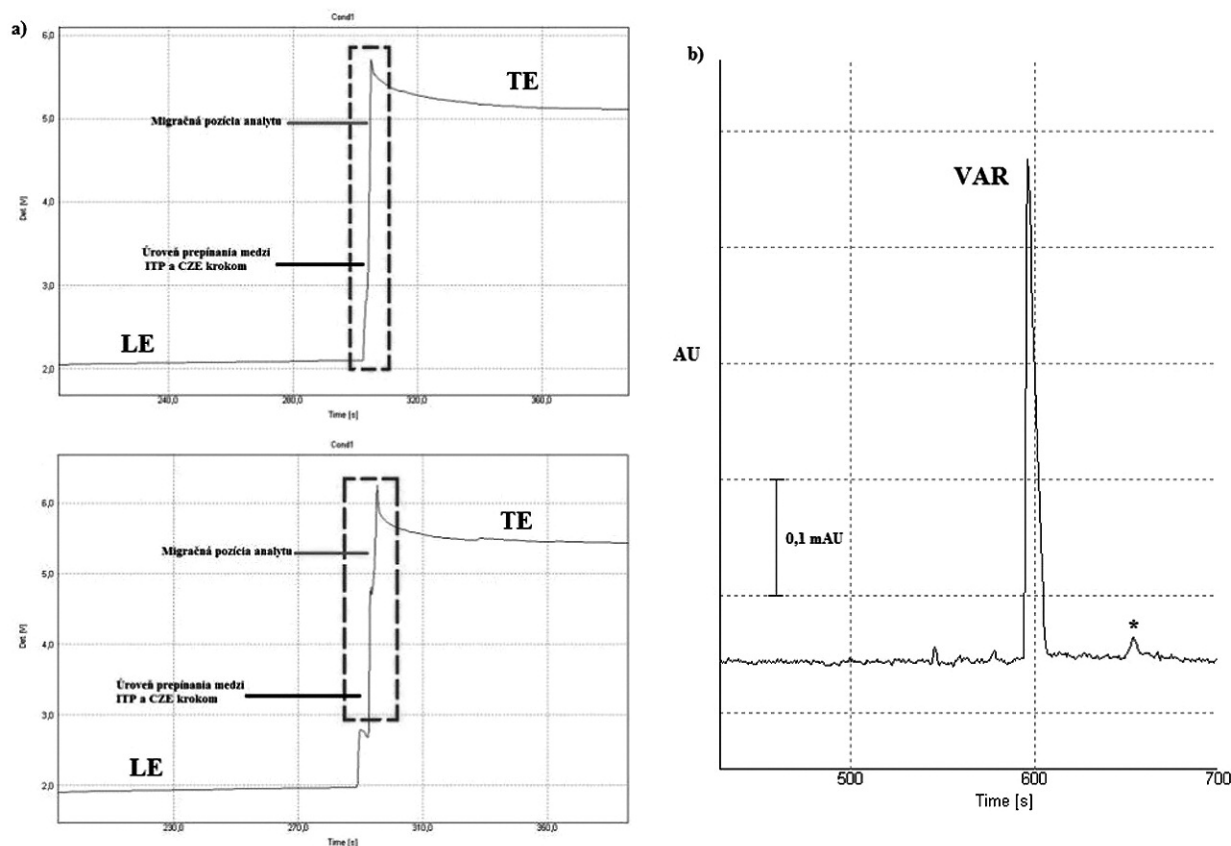
Presnosť vyjadrená ako opakovateľnosť bola určená ako relatívna štandardná odchýlka ( $RSD_{\text{plocha}}$ ) plôch analytického signálu a migračných časov ( $RSD_{\text{tm}}$ ) vzoriek s koncentráciou v rozsahu kalibračnej krivky, ktoré boli premerané šesťkrát (opakované meranie jednej koncentrácie roztoku štandardu). Dosiahnuté výsledky RSD hovoria o vhodne optimalizovanom analytickom systéme a jeho dobrej opakovateľnosti.

Robustnosť predstavuje mieru citlivosti a stability metódy voči malým zmenám v operačných parametroch. V našej práci sme pre test robustnosti menili koncentráciu základného (nosného) elektrolytu HAc v rozmedzí 18–22 mM. Zmena uvedeného parametra nevedla k výrazným zmenám v priebehu analýzy a k jej výsledkom a metóda bola osvedčená ako dostatočne robustná.

Správnosť CITP-CZE metódy sme hodnotili na základe výťažnosti, ktorá bola prevedená prostredníctvom štandardného prídavku roztoku štandardu vareniklínu o troch rôznych koncentráciách do roztoku matrice – tabletovej liekovej formy (viď časť *Príprava vzoriek pre hodnotenie výťažnosti*). Získané analytické signály (obr. 2b) zodpovedajúce fortifikovanej matrici boli konfrontované s matricou samotnou. Výťažnosť bola počítaná:  $\text{výťažnosť (\%)} = \{[c(\text{prídavku v testovanej vzorke}) - c(\text{analytu v testovanej vzorke bez prídavku})] / c(\text{prídavku v referenčnej vzorke})\} \cdot 100$ .



Obr. 2. Elektroforeogramy validačného procesu CITP-CZE metódy: a) roztoky štandardu vareniklínu o rôznej koncentrácii (testovanie linearity); b) testovanie výťažnosti. Detekcia v CZE kroku bola uskutočnená s nastavenou vlnovou dĺžkou 237 nm. Použitie vodiace prúdy boli 300  $\mu$ A (CITP) a 40  $\mu$ A (CZE). Ostatné separačné podmienky sú uvedené v časti *Optimalizácia separačných podmienok pre CITP-CZE experiment*.



Obr. 3. Záznamy z priamej CIPIT-CZE analýzy vzorky liekovej formy vareniklínu: a) porovnanie izotachforeogramov štandardu látky (horný záznam) s reálnou vzorkou (dolný záznam); b) elektroforeogram z CZE kroku separácie vzorky s približnou koncentráciou 100 ng/ml

VAR – vareniklín, \* – potenciálna nečistota, resp. degradačný produkt, LE – vodiaci elektrolyt, TE – zakončujúci elektrolyt  
 Detekcia v CZE kroku bola uskutočnená pri konštantnej vlnovej dĺžke 237 nm. Použitie vodiace prúdy boli 300  $\mu$ A (CIPIT) a 40  $\mu$ A (CZE). Ostatné separačné podmienky sú uvedené v časti Optimalizácia separačných podmienok pre CIPIT-CZE experiment.

Získané výsledky indikujú akceptovateľnú správnosť použitej metódy.

#### Aplikácia CIPIT-CZE metódy vo farmácii pre hodnotenie kvality liečiv a liekov

Navrhnutú a validovanú CIPIT-CZE-UV metódu sme aplikovali pri hodnotení obsahu účinnej látky – vareniklínu v tabletovej liekovej forme Champix® (obr. 3). Výrobca na náš farmaceutický trh dodáva liek s príslušným názvom v sile 1 mg (obsah liečiva v jednej tablete). Priemerný obsah vareniklínu v danej liekovej forme sa pohyboval na úrovni 1,008 mg, pričom RSD zo šiestich paralelných meraní bola 1,84 %. Výrobcom deklarovaný obsah je v zhode s nami dosiahnutými výsledkami, na základe čoho možno potvrdiť jednak kvalitu hodnoteného lieku a na strane druhej vhodnosť vypracovanej 2D-CE metódy pre tento účel.

#### Záver

Cieľom práce bolo navrhnutie, vypracovanie a validácia 2D-CE metódy s jednoduchou UV detekciou pre možnosti stanovenia obsahu liečiva vareniklínu v tabletovej liekovej forme dostupnej na európskom trhu s liekmi. Optimalizovaná CIPIT-CZE-UV metóda s použitím jednoduchých elektrolytových systémov bola validovaná s dobrou linearitou v rozsahu koncentrácií

20–500 ng/ml. Úplná separácia sa dosiahla v čase kratšom ako 10 minút. 2D-CE v spojení s UV detekciou tak predstavuje rýchlu a najmä lacnú analytickú metódu, ktorá sa na základe validačného procesu vyznačuje i vysokou účinnosťou, robustnosťou a citlivosťou. Zo získaných výsledkov vyplýva, že CIPIT-CZE je vhodnou alternatívnou a/alebo komplementárnou metódou v porovnaní s HPLC, ktorú predčuje najmä v jednoduchosti, ekologickosti, nákladoch na analýzu a separačnej účinnosti. Z pohľadu farmaceutického priemyslu a praxe tak do budúcnosti môže znamenať perspektívny prístup k hodnoteniu kvality liečiv a liekov, štúdiu ich farmakokinetiky a degradácie. Jednoduchosť použitých prchavých elektrolytových systémov 2D-CE zároveň vytvára reálny predpoklad pre jej on-line spojenie s MS detekciou, ktoré by z pohľadu vareniklínu mohlo viesť k efektívnemu hodnoteniu liečiva samotného, avšak i k detailnému popisu profilu nečistôt obsiahnutých v liečive, resp. jeho degradačných produktov.

#### Podakovanie

Autori ďakujú PharmDr. Michalovi Piešťanskému za darovanie lieku Champix®.

Stret záujmov: žiadny.

**Literatúra**

1. **Mackey J., Eriksen M.** The tobacco atlas. 1. vyd. London: Myriad Editions Limited 2002.
2. **Tomko J.** Farmakognózia. 2. vyd. Martin: Osveta 1999.
3. **Lüllmann H., et al.** Farmakologie a toxikologie. 15. vyd. Praha: Grada Publishing 2004.
4. **Tønnesen P.** Smoking cessation: How compelling is the evidence? A review. *Health Policy* 2009; 91, 15–25.
5. **Caponnetto P., Russo C., Polosa R.** Smoking cessation: present status and future perspectives. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2012; 12(3), 229–237.
6. [www.sigmaaldrich.com/catalog/product/SIGMA/PZ0004?lang=eng&region=SK](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/SIGMA/PZ0004?lang=eng&region=SK)
7. **Serafini A., Crespel A., Velizara R., Gelisse P.** Varenicline-induced grand mal seizure. *Epileptic Disord.* 2012; 12(4), 338.
8. **Rao J., Shankar P. K.** Varenicline: For smoking cessation. *Kathmandu Univ Med J* 2009; 7(2), 162–164.
9. **Kavcová E.** Vareniklín – nová možnosť v liečbe nikotínovej závislosti. *Via pract* 2008; 5(7/8), 308–312.
10. **Satheesh B., Kumarpulluru S., Raghavan V., Saravanan D.** UPLC Separation and quantification of related substances of varenicline tartrate tablet. *Acta Chromatogr* 2010; 22 (2), 207–218.
11. **Channabasavaraj K. P., Jagadish S. M., Sharath H. M.** Development and validation of RP-HPLC method for estimation of varenicline tartrate in bulk drug and tablet dosage form. *Int J Pharm Pharm Sci* 2011; 3(2), 59–61.
12. **Kadi A. A., Mohamed M. S., Kassem M. G., Darwish I. A.** A validated stability-indicating HPLC method for determination of varenicline in its bulk and tablets. *Chem Cent J* 2011; 5, doi: 10.1186/1752-153X-5-30
13. **Pujeri S. S., Khader A. M. A., Seetharamappa J.** Stress degradation studies on varenicline tartrate and development of a validated stability-indicating HPLC method. *Sci Pharm* 2012; 80, 115–126.
14. **Katakam P., Kalakuntla R. P., Sama J. R.** A novel stability indicating RP-HPLC assay method for the determination of varenicline in pharmaceutical formulations. *Pharmacologia* 2012; 3(6), 169–173.
15. **Kassem M. G., Attwa M. W., Abdelhameed A. S., Mustafa G. A. E.** An isocratic liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometric determination of varenicline in human plasma and dosage form. *Afr J Pharm Pharmacol* 2013; 7(20), 1343–1350.
16. **Al-Haj A., Alawi M., Arafat T., Hourani M. K.** Method development, validation and bioequivalence of varenicline in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2013; 931, 134–139.
17. **Alhazmi H. A., Makeen H. A., El Deeb S.** Determination of varenicline by capillary zone electrophoresis. *Dig J Nanomater Bios* 2013; 8(1), 295–301.
18. **Aleksic M. M., Radulovic V., Lijeskic N., Kapetanovic V.** Electrochemical response and determination of varenicline at boron doped diamond, glassy carbon and hanging mercury electrodes. *Curr Anal Chem* 2012; 8(1), 133–142.
19. **Kaniansky D., Marák J.** On-line coupling of capillary isotachopheresis with capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr* 1990; 498, 191–204.
20. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures Q2 (R1) Step 4 Version. 2005