

Badania próbek substancji z grupy NLPZ po fotodegradacji i analizie metodą ATR-FTIR oraz ATR-NIR wraz z przewidywaniem obecności mutagennych zanieczyszczeń *in silico*

Marzena Jamrógiewicz*, Mikołaj Roszman



Katedra i Zakład Chemii Fizycznej, Wydział Farmaceutyczny,
Gdański Uniwersytet Medyczny

Konferencja: V Sympozjum „Szkoła Chemii Medycznej”
16–18 września 2024 roku, Miejsce: Gdańsk

www.gumed.edu.pl

Syntetyczne drogi otrzymywania substancji leczniczych, ale też ich narażenie na czynniki tj. podwyższona temperatura, światło lub nadmierna wilgotność mogą skutkować wprowadzeniem potencjalnie mutagennych zanieczyszczeń do produktu końcowego. Wytyczne ICH M7 [1] oferują szereg opcji kontroli, które zapewniają, że poziom tego zanieczyszczenia w substancji leczniczej i produkcie leczniczym będzie poniżej dopuszczalnego limitu. Różne narzędzia *in silico* oferują ustandaryzowane i konserwatywne podejście do obliczania i szacowania ilości powstających zagrożeń. W projekcie zastosowano podejście oparte na degradacji próbek z grupy NLPZ po naświetlaniu w komorze Suntest CPS+, ich badaniu metodą ATR-FTIR i ATR-NIR i przewidywaniu *in silico* na podstawie zmian w widmach powstania grup chemicznych odpowiadających za mutagenność. Prognozy przeprowadzono dla przynajmniej 30 różnych zanieczyszczeń substancji z grupy NLPZ tj. **naproksenu, indometacyna, diklofenak, ibuprofen i ketoprofen** [2] z wykorzystaniem oprogramowania Zeneth 9.0, Lhasa Limited [3]. Studia przypadków wykazały zarówno pozytywną jak i negatywną przewidywalność mutagenności.

CEL pracy: badanie i ocena fotodegradacji substancji leczniczych z grupy NLPZ pod kątem obecności produktów degradacji o działaniu mutagennym.

Materiały i metody

Indometacyna zakupiono w firmie Sigma-Aldrich (nr seryjny 065M4173V, Sigma Aldrich). Naproksen NAP/M-003/97 i partię naproksenu sodowego NpxNa SN-1490897 zakupiono od Sigma-Aldrich. Diklofenak sodowy nr serii AG003PE0 zakupiono od firmy TRIMEN, Ibuprofen nr serii 4050 3028 otrzymano z POLPHARMA S.A., Ketoprofen nr serii 10122003 otrzymano od firmy UNIA.

Fotodegradacja

Próbki naświetlano w komorze Suntest CPS+ Atlas W szklanej fiolce o pojemności 20 ml umieszczono sproszkowane substancje (0,2 g). Równoległe z badaniem fotostabilności drugie naczynie z tą samą próbką umieszczono w komorze ekspozycyjnej, ale były ściśle przykryte folią aluminiową – „ślepe”. Próbki poddano działaniu promieniowania o mocy 500 W/m². Badano je po naświetlaniu trwającym 24 h i 48 h.

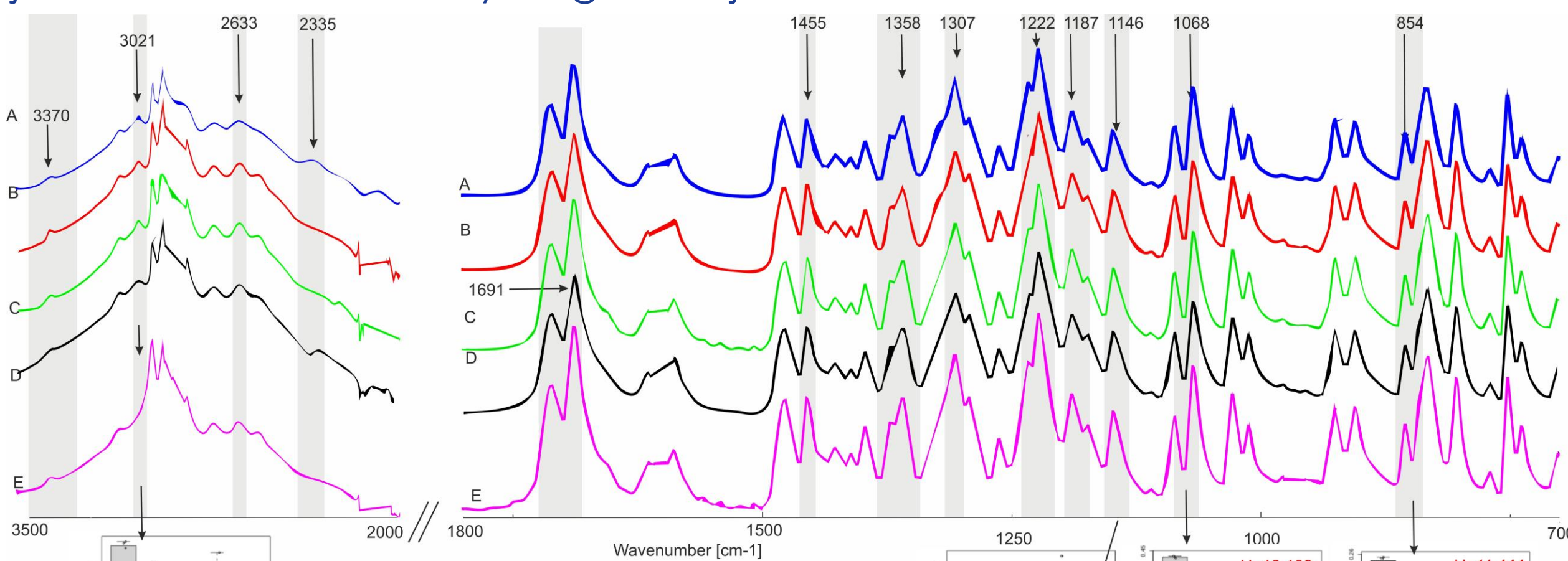
Analiza spektrofotometryczna ATR-FTIR i ATR-NIR

Przy wykorzystaniu techniki odbiciowej spektroskopii w zakresie podczerwieni i bliskiej podczerwieni ATR na kryształach diamentowym wykonano analizę wzorców oraz API po degradacji fotochemicznej. Rejestrację widm prowadzono w spektrofotometrze 4700LE Jasco.

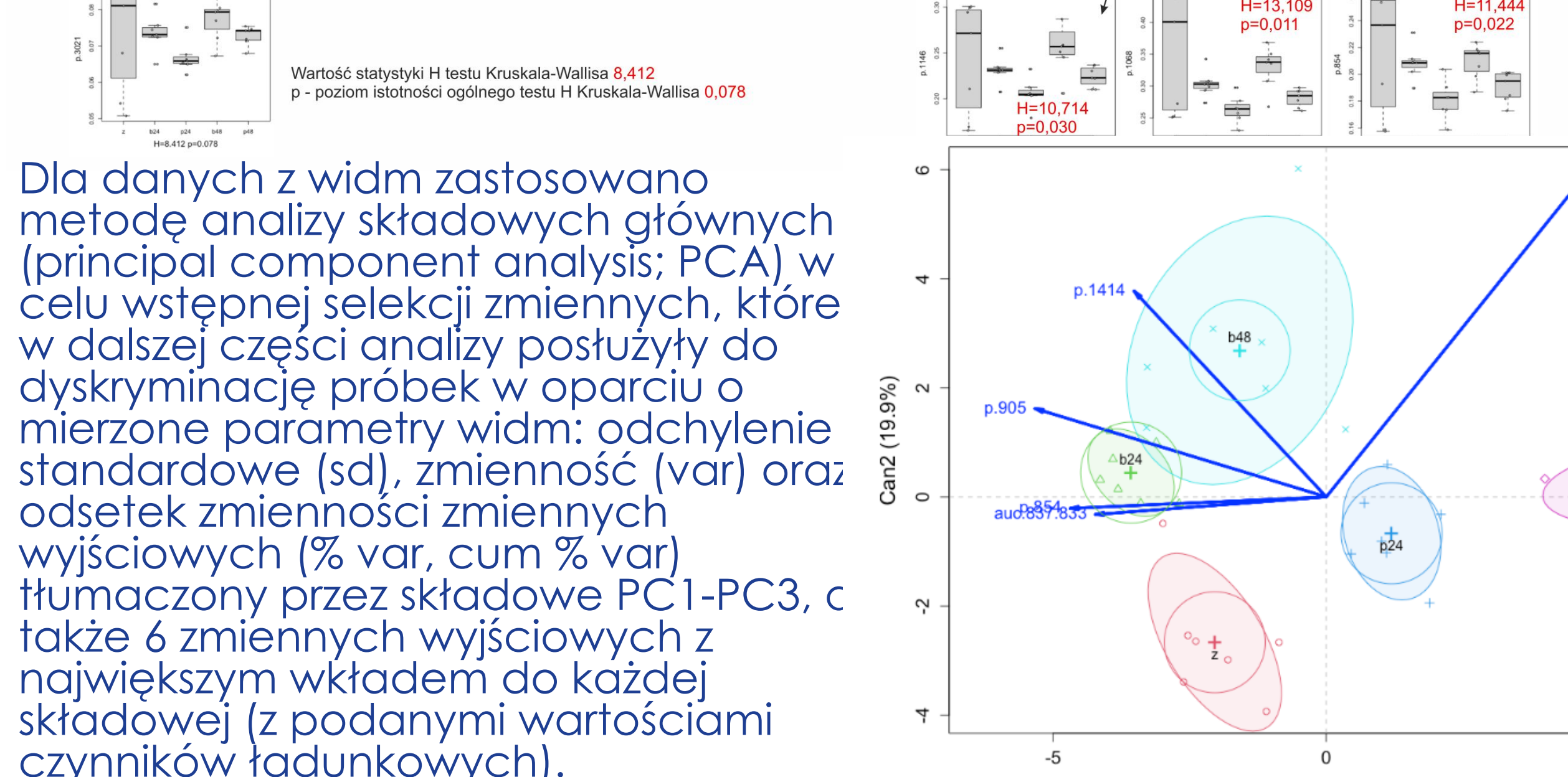
Wyniki i dyskusja

Metodą FTIR oraz ATR-FTIR oraz NIR i ATR-NIR zweryfikowano fotochemiczny rozkład API. Przy użyciu oprogramowania Zeneth Lhasa Ltd. W tabelach 1-3 zebrano produkty degradacji dla najbardziej popularnych substancji leczniczych z grupy NLPZ. Zbudowano wielowymiarowy model umożliwiający odróżnienie próbek zdegradowanych naświetlaniem od pozostałych. Udało się wyodrębnić dwa klastry z analizy FTIR jak i NIR w technice transmisyjnej. Próbki naświetlane występują wyraźnie odrębnie od próbek zerowych i „ślepych prób”.

Pomimo faktu, że spektroskopia FTIR i NIR jest stosowana w przemyśle farmaceutycznym, a dodatkowo od 2019 r. technika ATR została włączona jako analiza farmakopealna należy zaznaczyć, że z wyników ATR-NIR bardzo trudno jest uzyskać powtarzalność i jednoznaczność oceny degradacji.



Ryc. 1. Widma ATR-FTIR indometacyny (niebieski), po 24h (czerwony), po 24h ślepa (zielony), po 48h (czarny) i po 48h ślepa (różowy)



Ryc. 2. Klasterizacja próbek w przestrzeniach 2D tworzonych przez pierwsze 3 funkcje dyskryminacyjne (na rysunkach oznaczone symbolami Can1, Can2, Can3).

Dla danych z widm zastosowano metodę analizy składowych głównych (principal component analysis; PCA) w celu wstępnej selekcji zmiennych, które w dalszej części analizy posłużyły do dyskryminacji próbek w oparciu o mierzone parametry widm: odchylenie standardowe (sd), zmienność (var) oraz odsetek zmienności zmiennych wyjściowych (% var, cum % var) tłumaczony przez składowe PC1-PC3, a także 6 zmiennych wyjściowych z największym wkładem do każdej składowej (z podanymi wartościami czynników ładunkowych).

PIŚMIENNICTWO

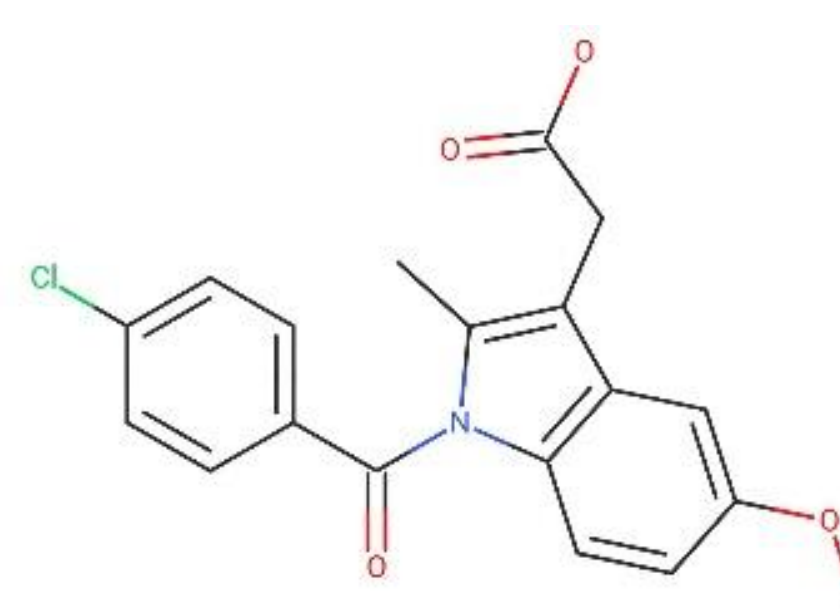
- M7(R1) assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk https://database.ich.org/sites/default/files/M7_R1_Guideline.pdf
- Jamrógiewicz, M., Bray, A., Gołtuński, G., Będzińska, P., Zakrzewski, M. (2024). Photodegradation of indomethacin and naproxen contained within commercial products for skin-RAP. J. Pharm. Biomed. Anal., 2024, 116201.
- Lhasa Limited. Zeneth. Leeds UK: Lhasa Limited.; 2024; Version 9:(Available from: www.lhasalimited.org/zeneth/).

PODZIĘKOWANIA

Badania zostały zrealizowane w ramach uzyskanego wsparcia finansowego służącego rozwojowi Doświadczonych Badaczy GUMed nr 71-01415/0004595/61/518/518/2023

Tab. 1. Zanieczyszczenia farmakopealne indometacyny ulegające fotodegradacji

C	D	E	F
G	H	I	J

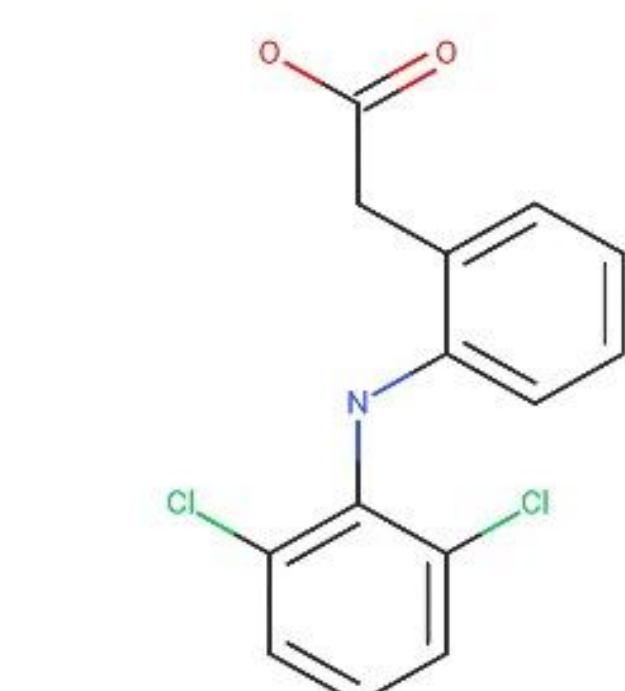


Ryc. 3. Wzór strukturalny indometacyny

Warto zwrócić uwagę na fotowalność samych zanieczyszczeń **indometacyny** (Tab. 1), ponieważ farmakopealne zanieczyszczenia C, D, E, F, G, H, I i J są także znaczącym źródłem narażenia i ulegają reakcjom fotochemicznym i rodnikowym. Z kolei farmakopealne zanieczyszczenie B (chloro), C (bromo) i D (jodo) **naproksenu** może ulegać reakcji reakcji fotodehalogenacji i racemizacji, a zanieczyszczenie N fotodehalogenacji (Br). Warto też zwrócić uwagę, że niemal wszystkie zanieczyszczenia farmakopealne **diklofenaku** (poza E) ulegają fotodegradacji poprzez fotodehalogenację i fotocyklizację. Spośród zanieczyszczeń farmakopealnych **ibuprofenu** szczególnie zanieczyszczenie H i M są ulegają fotodegradacji z uwagi na strukturę chemiczną M – fotodekarboksylację, a H – cykloaddycję i fotolizę. Warto także zaznaczyć, że farmakopealne zanieczyszczenia D, J, K i L **ketoprofenu** także ulegają fotodegradacji:

Tab. 2. Zanieczyszczenia farmakopealne diklofenaku ulegające fotodegradacji

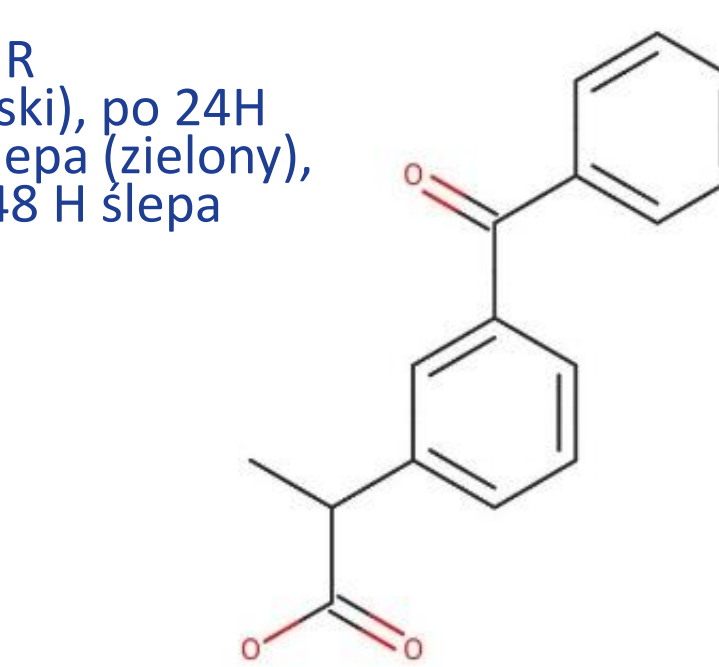
A	B	C	D	F



Ryc. 4. Wzór strukturalny diklofenaku

Tab. 3. Zanieczyszczenia farmakopealne ketoprofenu ulegające fotodegradacji

D	J	K	L
Fotoprodukty			



Ryc. 5. Wzór strukturalny ketoprofenu

Wnioski

Dla analizy ATR-FTIR IND udało się także znaleźć sprawny i statystycznie istotny model 5-stopnia oparty o funkcje dyskryminacyjne, umożliwiający prawidłową dyskryminację próbek typu „photo” (z praktycznie 100%-ową sprawnością). Model nie jest w stanie dobrze rozróżnić próbki typu „blind” i „zero”.

Spośród pięciu badanych w pracy najbardziej niebezpieczna jest **indometacyna** posiadająca także potencjał leczenia nowotworów dzięki cytotoksyczności, ale też **diklofenak** z powodu (podobnie jak w indometacynie atom azotu, tu diarylo halogeno aminy). Co do **ibuprofenu** to jego łatwość tworzenia rodników i utleniania pod wpływem światła stanowi uzasadnione zagrożenie podczas nadużywania stosowania, a produkty degradacji **naproksenu** powinny być szczególnie monitorowane pod kątem potencjalnych zagrożeń nowotworzenia u osób przyjmujących go całe życie. **Ketoprofen** z racji łatwości fotowzbudzenia jest z pewnością cząsteczką o szczególnej zdolności wywoływania uczuleń w badanej grupie API, bez stwierdzonej genotoksyczności i mutagenności.