



*Maria Giovanna Quaglia, Enrica Donati
Dipartimento Studi Farmaceutici
Università di Roma "La Sapienza"
Salvatore Fanali
CNR - Istituto di Metodologie Chimiche
C.P. 10 - 00016 Monterotondo Scalo - Roma*

ELETTROFORESI CAPILLARE ED ELETTROCROMATOLOGRAFIA

nello studio della qualità e dell'attività dei farmaci

La disponibilità di strumenti HPLC sempre più sofisticati permette di determinare con accuratezza un farmaco in presenza delle sue impurezze. L'attenzione degli Autori è stata però attratta da altre tecniche separative, quali l'elettroforesi capillare (CE) e l'elettrocromatografia (CEC). Infatti in un nostro studio, in parte pubblicato, sulle metodiche migliori per il controllo di qualità dei farmaci abbiamo messo a punto metodi di analisi quali-quantitativa mediante CE e CEC.

I farmaci indagati sono stati l'ibuprofen, la petidina e l'aspirina

La selettività della CEC e l'alta efficienza della CE, la disponibilità di strumenti che dispongono di detector sempre più sofisticati hanno reso le tecniche elettroforetiche alternative alle tecniche cromatografiche in tutte le tematiche che interessano l'analisi farmaceutica. Uno degli argomenti più diffusi in questo settore della ricerca è lo studio di metodi per la determinazione di un farmaco e delle sue impurezze potenziali (controllo della qualità). In un nostro studio recente, in parte già pubblicato (1, 2), sono stati confrontati metodi di analisi eseguiti mediante CE e CEC con metodi HPLC (3, 4) per verificarne la "suitability" nella determinazione dei prin-

cipi attivi e delle loro potenziali impurezze. I farmaci studiati sono stati l'ibuprofen, un antiinfiammatorio non steroideo di largo impiego, la petidina, usata nella terapia del dolore, e l'aspirina, un "sempreverde" cui vengono attribuite di continuo nuove attività terapeutiche.

Secondo la Farmacopea Italiana X edizione, ma anche secondo la Farmacopea Europea, le impurezze più frequenti che possono essere presenti nell'ibuprofen sono: l'acido 2-(*-*isobutilfenil)propionico (A), l'acido 2-(4-butilfenil)propionico (B), la 2-(4-isobutilfenil)propionamide (C), l'acido 2-(4-metilfenil)propionico (D) e l'4-isobutilacetofenone (E).

Per un'indagine quali-quantitativa di queste impurezze la Farmacopea suggerisce un'analisi mediante HPLC in fase inversa; nel nostro lavoro abbiamo usato l'elettrocromatografia. La petidina, l'altro composto studiato, è un agonista dei recettori μ e viene usata nella terapia del dolore. Ora il suo impiego è stato limitato a causa della possibile presenza di un'impurezza molto tossica. Infatti la possibile idrolisi del gruppo estereo della petidina porta alla formazione dell'*N*-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), un composto molto tossico che contamina il farmaco. Per la determinazione di questa impurezza è dunque necessario disporre di un metodo di analisi selettivo e sensibile.

Anche in questo caso abbiamo usato una tecnica elettroforetica.

È nota la facilità di idrolisi dell'aspirina che porta alla formazione di molte impurezze, tutte a carattere acido. Nella nostra indagine ne abbiamo considerate 4 e precisamente: l'acido idrossisottalico, l'acido salicilico, l'acido acetilsalicilico e l'anidride acetilsalicilica.

La determinazione dei tre principi attivi citati e delle loro potenziali impurezze è stata dunque eseguita mediante CE e CEC.

L'aspetto sperimentale di un'analisi eseguita mediante CEC è molto simile a quello della CZE con la differenza che il capillare elettroforetico è impaccato con una fase stazionaria, nel nostro caso con una RP-18.

La CEC può essere quindi considerata una HPLC eseguita mediante un sistema elettroforetico. In teoria tutti i composti possono essere separati mediante CEC. In pratica però la separazione di composti carichi è influenzata dal campo elettrico applicato, dalle interazioni degli analiti con la fase stazionaria e dalle differenze nell'elettromigrazione. La separazione di composti non carichi invece è influenzata solo dalle diverse interazioni con la fase mobile e la fase stazionaria. Dal processo sintetico in genere usato per la produzione dell'ibuprofen possono rimanere nel "raw material" le impurezze sopra menzionate. Nel nostro lavoro però sono state considerate solo le impurezze A, B, C, E, non avendo a disposizione lo standard dell'impurezza D.

Condizioni sperimentali

Ibuprofen

L'analisi è stata eseguita mediante CEC.

Il capillare è stato impaccato con una fase stazionaria RP-18 ed eluito con soluzione acquosa di acido formico 100 mM, titolato fino a pH 2,5 con ammoniaca (soluzione acquosa), acqua ed acetonitrile (ACN) nel rapporto 10/40/50. Il capillare è stato equilibrato per 30 min. applicando una pressione di 12 bar all'inizio del capillare. Il voltaggio applicato (25 kV) e la pressione vengono mantenuti costanti. Le analisi per la messa a punto del metodo sono state eseguite esclusivamente con sostanze standard.

Petidina

Il controllo è stato eseguito mediante elettroforesi zonale e mediante elettroforesi micellare, confrontando la sensibilità di questi due metodi con il metodo HPLC. Le condizioni di lavoro nei tre metodi sono state: HPLC - fase stazionaria RP-18, eluente: tampone fosfato (pH 7) contenente acetonitrile e 1% di dietilammina; CE - tampone ammonio acetato (pH 8,3); MEKC - tampone borato (pH 8,9) contenente sodio dodecilsolfato e trimetil-β-ciclodestrine.

Aspirina

CEC - Lichrosphere 100 RP-18, eluente: 100 mM HCOOH/CH₃CN/H₂O

λ = 200 nm, 25 kV, 25 °C, 12 bar x 12 sec.

CE: capillare uncoated, lunghezza effettiva

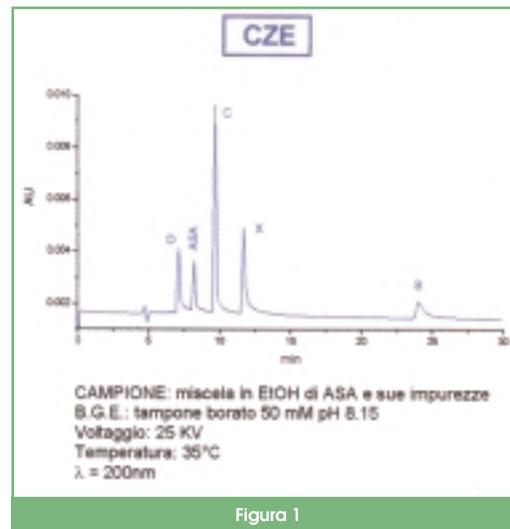


Figura 1

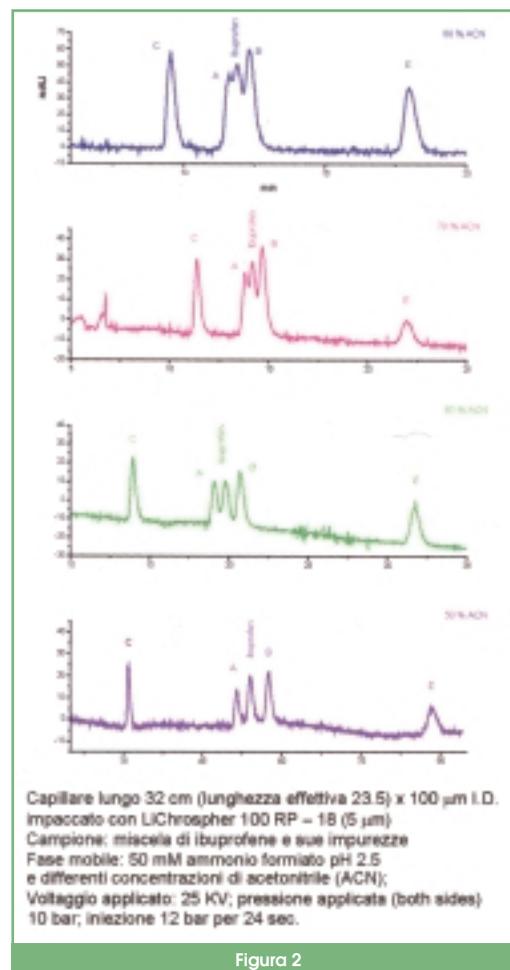


Figura 2

The Suitability of CE and CEC in the Investigation of Drug Quality and Activity

ABSTRACT

Today the greater availability of instruments more and more sophisticated allowed to determine with accuracy the drug and its related substances (impurities). Undoubtedly the HPLC is the separative technique more used in this research field, but our attention was attracted from other separative technique like Capillary Electrophoresis (CE) and Electrochromatography (CEC). In one of our studies on the quality control of some drugs, partially published, we carried out the quali-quantitative analysis by CE, CEC and HPLC and their suitabilities were compared. The drugs investigated was ibuprofen, pethidine and aspirin.

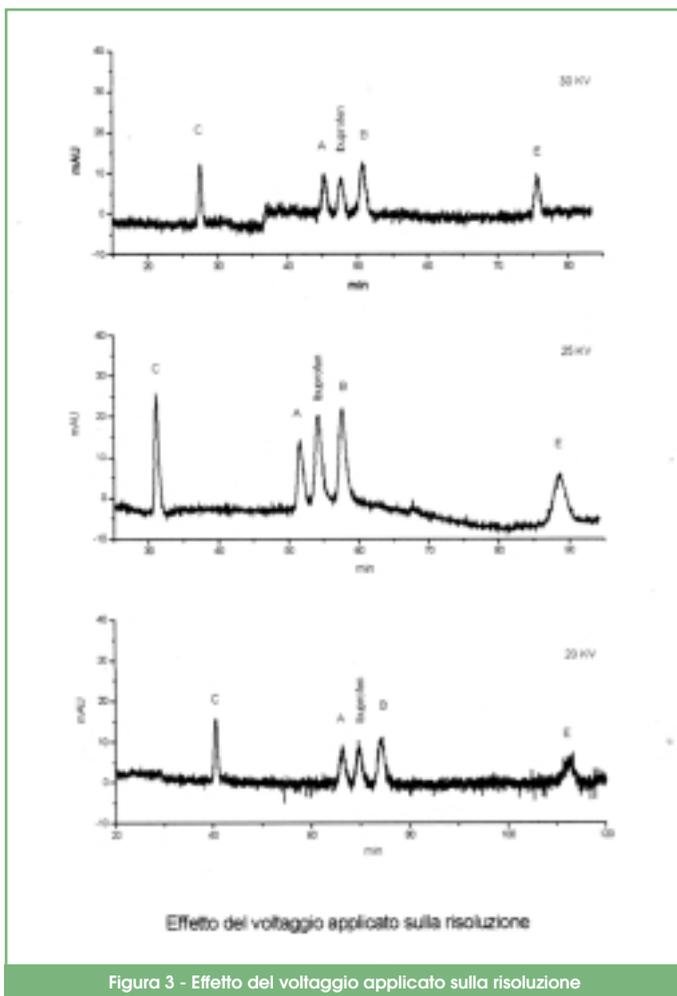


Figura 3 - Effetto del voltaggio applicato sulla risoluzione

44 cm, I.D.=50 mm, tampone borato 50 mM pH=8,5.

Anche in questo caso i risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli cromatografici: HPLC - fase stazionaria RP-18, eluente: H₃PO₄/CH₃CN/H₂O (2:400:600), flusso 1 ml/min.; λ = 237 nm.

Risultati

Il controllo di qualità dell'ibuprofen è stato fatto mediante CEC. Sia l'ibuprofen che le

quantità di modificatore organico da aggiungere alla fase mobile. Infatti è stato notato che la concentrazione del modificatore organico influenzava il flusso elettroosmotico e quindi la mobilità degli analiti ed il fattore di ritenzione (Figura 1). Anche il voltaggio da applicare ha richiesto un'indagine attenta (Figura 2). Il metodo elettrocromatografico, confrontato con un metodo HPLC, ha evidenziato rispetto a quest'ultimo una selettività ed

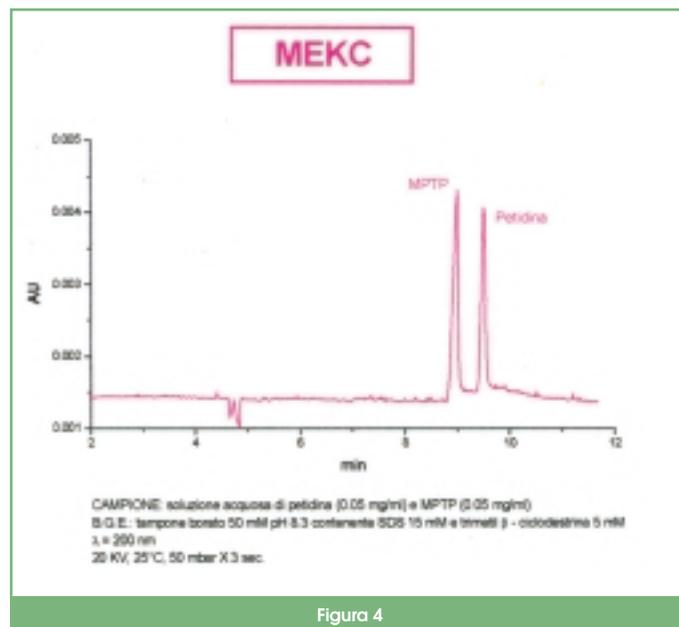


Figura 4

sue impurezze hanno proprietà acide e questo spiega la scelta del tampone e del pH di lavoro. Per ottenere una buona risoluzione degli analiti è stato fatto un attento studio sulla

un'efficienza superiore. Anche per l'aspirina la CEC si è rivelata una tecnica sensibile e selettiva (Figura 3).

La tossicità di MPTP, l'impurezza della petidina, richiede un metodo di analisi sensibile e selettivo. Noi abbiamo scelto per questa determinazione sia l'elettroforesi zonale sia micellare, confrontando quindi la loro sensibilità con quella del metodo HPLC (Figura 4). Come generatore di micelle è stato usato il sodiododecilsolfato nel running buffer a cui sono state addizionate trimetil-β-ciclodestrine.

Lo scopo principale della nostra ricerca è stato quello di verificare se la CEC sia una tecnica alternativa all'HPLC nel controllo di qualità dei farmaci. Dai risultati ottenuti è evidente che la CEC mostra un'efficienza ed una selettività del tutto comparabili e forse superiori all'HPLC, sebbene il tempo di analisi è in alcuni casi leggermente superiore, come nel caso dell'ibuprofen.

Bibliografia

- (1) M.G. Quaglia *et al.*, *Il Farmaco*, 2003, **58**, 699.
- (2) M.G. Quaglia *et al.*, *J. Pharm. Biom. Anal.*, 2003, **33**, 1.

- (3) K. Kelly, M.G. Kaledi, *High Performance Capillary Electrophoresis*, Wiley Interscience, New York, 1998, 285.
- (4) C. Desiderio, S. Fanali, *J. Chromatogr. A*, 2000, **895**, 123.