

Serena Orlandini, Sandra Furlanetto,
Sergio Pinzauti
Dipartimento di Scienze Farmaceutiche
Università di Firenze
Salvatore Fanali
Istituto di Metodologie Chimiche - CNR
Area della Ricerca di Roma
Monterotondo Scalo (Roma)
serena.orlandini@unifi.it



SVILUPPO DI UN METODO MEKC

Un'applicazione di disegno sperimentale in analisi farmaceutica

Negli ultimi trent'anni il disegno sperimentale è entrato a far parte del bagaglio culturale di molti chimici analitici, che hanno individuato in questo strumento la possibilità di ottenere in modo efficace e razionale la risposta a molti problemi di ottimizzazione.

In questo articolo è presentato un esempio di applicazione di questa strategia nell'ottimizzazione e nella convalida di un metodo MEKC per la determinazione del farmaco antinfiammatorio ketorolac e delle sue impurezze in forma farmaceutica.

L'analisi farmaceutica è uno strumento necessario per assicurare una somministrazione sicura ed efficace di farmaci. Infatti, lo sviluppo di tecniche analitiche appropriate è parte integrante della nascita e della vita di un farmaco dal momento che metodi analitici convalidati sono di supporto per gli studi di farmacocinetica, di profilo metabolico, di stabilità fino all'assicurazione di qualità del prodotto finale. Nella ricerca e sviluppo ingenti risorse sono impiegate per risolvere problemi di ottimizzazione. Sia che si tratti di una formulazione, un processo, o un metodo, è necessario effettuare esperimenti per trovare le condizioni ottimali. D'altra parte i dati necessari dovrebbero essere ottenuti con il minor costo possibile sia in termini di tempo che di denaro, evitando esperimenti

inutili. Una strategia capace di rispondere in modo adeguato a queste esigenze è una strategia multivariata quale il disegno sperimentale. Si tratta di una disciplina in cui i fattori pertinenti sono variati in modo simultaneo e sistematico in modo da ottenere la massima e la migliore qualità di informazione con il minimo sforzo. Le tecniche di disegno sperimentale hanno rivoluzionato l'ap-

proccio per la risoluzione dei problemi di ottimizzazione. Infatti, il metodo tradizionale OVAT (one variable at a time) appare molto meno efficiente, razionale ed economico del disegno sperimentale, come si evince dalle caratteristiche delle due strategie, riportate in Tabella 1 (1). In particolare, questo articolo ha lo scopo di focalizzare i vantaggi dell'uso del disegno sperimentale nello

Tabella 1 - Confronto tra le caratteristiche del metodo OVAT e del disegno sperimentale

OVAT	DISEGNO SPERIMENTALE
Pseudoconvergente (Non porta necessariamente al reale <i>optimum</i>)	Convergente (Porta al reale <i>optimum</i>)
Inefficiente (presenza di esperimenti non necessari)	Efficiente (minimo numero esperimenti)
Nessuna informazione su interazioni tra fattori	Informazione su interazioni tra fattori
Nessuna informazione circa condizioni non testate	Possibilità di ottenere modelli predittivi

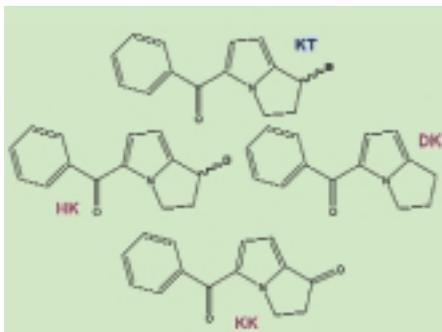


Figura 1 - Formule di struttura di ketorolac (KT) e sue impurezze (HK, KK, DK)

sviluppo di metodi analitici in campo farmaceutico. L'esempio considerato è un metodo elettroforetico MEKC (Micellar Electrokinetic Chromatography) per la determinazione nella forma farmaceutica del farmaco antinfiammatorio ketorolac (KT) e delle sue tre potenziali impurezze (1-idrossi analogo (HK), 1-keto analogo (KK) e ketorolac decarbossilato (DK)) (2), la cui struttura è riportata in Figura 1. Questo metodo, dimostratosi rapido, economico, semplice e a bassissimo impatto ambientale, è stato sviluppato nell'ottica di un uso di routine in controllo di qualità. Le prestazioni richieste al metodo erano separazione completa degli analiti, veloce tempo di analisi e limiti di quantificazione pari allo 0,1% p/p per le impurezze. Come standard interni sono stati selezionati acido flufenamico (FL) e sodio tolmestina (TL), rispettivamente per il ketorolac e per le impurezze.

Ottimizzazione del metodo MEKC

L'elettroforesi capillare micellare (MEKC) è una tecnica ibrida tra elettroforesi capillare e cromatografia e viene utilizzata per la separazione di composti neutri e carichi. La separazione avviene all'interno di un capillare di silice fusa riempito di un opportuno tampone definito "background electrolyte" (BGE), alle cui estremità viene applicato un campo elettrico. La selettività delle separazioni è ottenuta aggiungendo al BGE tensioattivi ad una concentrazione superiore alla loro concentrazione micellare critica. Le micelle che si formano possono interagire con i soluti con interazioni idrofobiche ed elettrostatiche: se gli analiti presentano diverso coefficiente di riparti-

zione tra fase micellare e BGE, si può ottenere la loro separazione.

Selezione delle risposte e dei fattori

Per trovare le condizioni ottimali del metodo MEKC per la determinazione del ketorolac e delle sue impurezze era necessaria un'accurata indagine dei fattori pertinenti sulle risposte in studio. Il nostro scopo, come accennato, era quello di mettere a punto analisi che permettessero una rapida separazione di tutti gli analiti, quindi sono state scelte come risposte il tempo di analisi (t) e le risoluzioni critiche tra i picchi (indicate con R_1 (KT/TL), R_4

sentare interazioni l'una con l'altra. La scelta della zona sperimentale in cui effettuare le prove era poi molto importante perché poteva influenzare i risultati. Per ciascuno dei fattori è stato quindi selezionato un opportuno range di studio che ha definito il *dominio sperimentale*.

Pianificazione della strategia sperimentale e risultati ottenuti

Mediante l'uso del disegno sperimentale è possibile effettuare semplicemente una selezione di quei fattori che realmente influenzano la risposta o le risposte nel dominio speri-

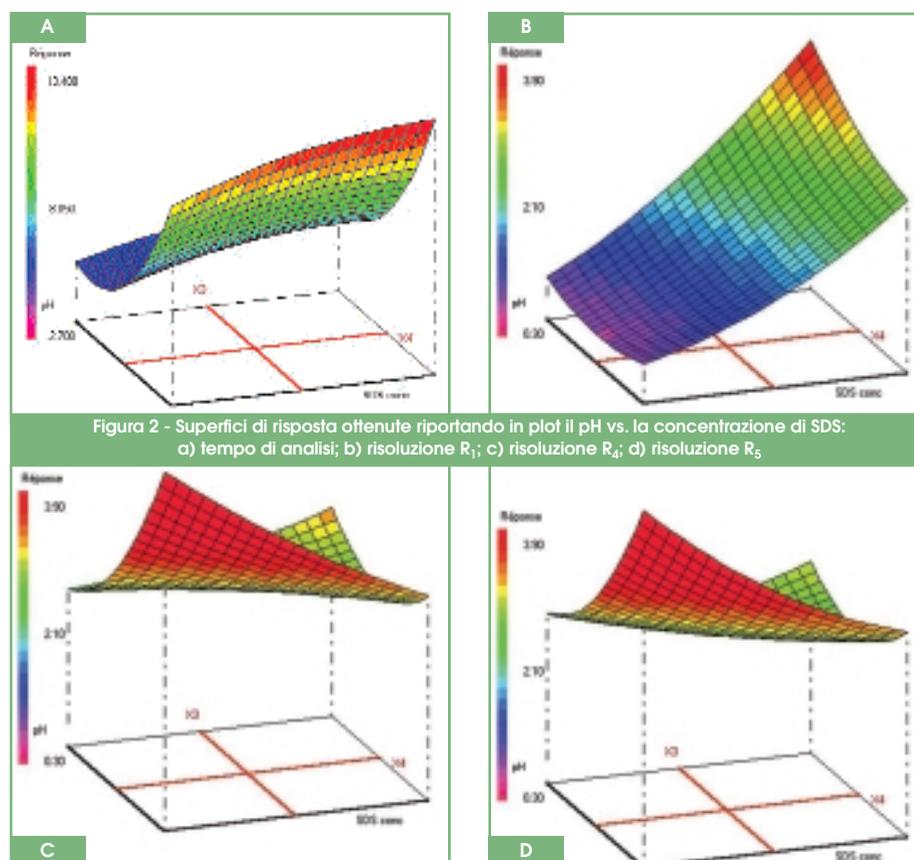


Figura 2 - Superfici di risposta ottenute riportando in plot il pH vs. la concentrazione di SDS: a) tempo di analisi; b) risoluzione R_1 ; c) risoluzione R_4 ; d) risoluzione R_5

(HK/KK) ed R_5 (KK/DK)). Con un numero ridotto di esperimenti preliminari sono stati scelti l'elettrolita (miscela borato/fosfato) e il tipo di tensioattivo (sodio dodecilsolfato, SDS). Restava però da effettuare lo studio dell'effetto di diversi fattori: pH e concentrazione dell'elettrolita (buffer conc.), concentrazione di SDS (SDS conc.), temperatura (T), voltaggio (V). Tutte queste variabili possono influenzare le analisi MEKC e soprattutto possono pre-

mentale studiato (*screening*) oppure è possibile trovare un modello matematico che consenta la predizione della risposta o delle risposte anche in punti all'interno del dominio sperimentale non esplorati (*studio della superficie di risposta*). In questo caso è stato effettuato uno studio della superficie di risposta mediante un Disegno di Doehlert (3), che permette di trovare i coefficienti della funzione polinomiale di tipo quadratico che si sup-

Tabella 2 - Piano sperimentale e risposte ottenute

V (kV)	buffer conc. (mM)	pH	SDS conc. (mM)	T (°C)	t (min.)	R ₁	R ₄	R ₅
30	15	8,8	65	27	6,015	1,57	3,27	3,17
29	20	8,8	65	27	6,822	1,97	3,37	3,71
29	10	8,8	65	27	5,786	0,95	2,42	2,20
25	20	8,8	65	27	8,684	2,12	3,03	2,90
29	17	9,6	65	27	5,422	2,13	3,10	3,02
25	13	8,0	65	27	12,739	1,41	3,49	3,17
25	17	9,6	65	27	6,968	2,22	2,56	2,44
27	12	9,6	65	27	5,508	1,39	2,10	1,85
29	17	9,0	80	27	6,352	2,95	2,96	3,01
25	13	8,6	50	27	7,478	0,62	3,04	2,98
27	18	8,6	50	27	7,572	0,96	3,87	4,01
25	17	9,0	80	27	8,132	3,16	2,56	2,35
27	12	9,0	80	27	6,567	2,33	2,25	2,04
27	15	8,2	80	27	10,542	2,46	2,92	2,87
29	17	9,0	68	30	5,779	1,80	3,04	3,07
29	13	8,6	62	24	6,902	1,27	3,03	2,90
27	18	8,6	62	24	8,704	1,97	3,54	3,33
27	15	9,4	62	24	6,455	1,77	2,77	2,40
27	15	8,8	77	24	7,920	2,69	2,67	2,32
25	17	9,0	68	30	7,291	1,94	2,62	2,57
27	15	8,2	68	30	9,241	1,51	3,59	3,40
27	15	8,8	65	27	7,422	1,57	2,93	2,79
27	15	8,8	65	27	6,998	1,49	2,55	2,55
27	15	8,8	65	27	6,936	1,53	2,85	2,70
27	15	8,8	65	27	7,016	1,58	3,01	2,85

pone esistere tra fattori e risposta.

In Tabella 2 sono riportati gli esperimenti eseguiti (*piano sperimentale*) insieme alle risposte ottenute. La trattazione statistica dei dati ha permesso di trovare quattro diverse funzioni polinomiali, una per ciascuna risposta, la cui rappresentazione grafica dà luogo a superfici di risposta facilmente interrogabili (3). In Figura 2, a titolo di esempio, sono raffigurate quelle ottenute riportando pH e concentrazione di SDS e mantenendo ad un valore fissato le altre due variabili in studio. La prima considerazione che deve essere fatta è che rispetto all'approccio OVAT abbiamo ottenuto una "mappa" che ci per-

mette di orientarci e muoverci all'interno del dominio sperimentale verso la direzione di risposta ottimale. Possiamo ad esempio osservare che per massimizzare la risposta R₁ (Figura 2b) occorre usare valori elevati di pH e di concentrazione di tensioattivo, mentre per le risposte R₄ (Figura 2c) ed R₅ (Figura 2d) valgono considerazioni opposte. Infatti per queste ultime esiste un'interazione molto importante tra le due variabili che porta alla massimizzazione della risoluzione quando entrambe le variabili assumono i valori più bassi del dominio sperimentale. Appare evidente quindi che la scelta dell'*optimum* non è immediata, perché le con-

dizioni necessarie per ottimizzare una risposta piuttosto che un'altra possono essere in conflitto tra di loro. Uno strumento del disegno sperimentale che permette di superare facilmente questo problema è l'*ottimizzazione multicriterio* mediante la funzione di Derringer (3, 4). Questo approccio porta ad una funzione detta di desiderabilità le coordinate del cui massimo rappresentano le condizioni sperimentali che danno luogo al miglior compromesso tra le risposte in studio. In particolare, il software di disegno sperimentale (5) ci fornisce le condizioni ottimali, individuabili anche attraverso la rappresentazione grafica della funzione di desiderabilità, che nel presente caso sono risultate essere le seguenti: V, 27 kV; buffer conc., 13 mM; pH, 9,1; SDS conc., 73 mM; T, 30 °C. Applicando queste condizioni la completa risoluzione tra i picchi veniva ottenuta in circa sei minuti, come si osserva dalla Figura 3.

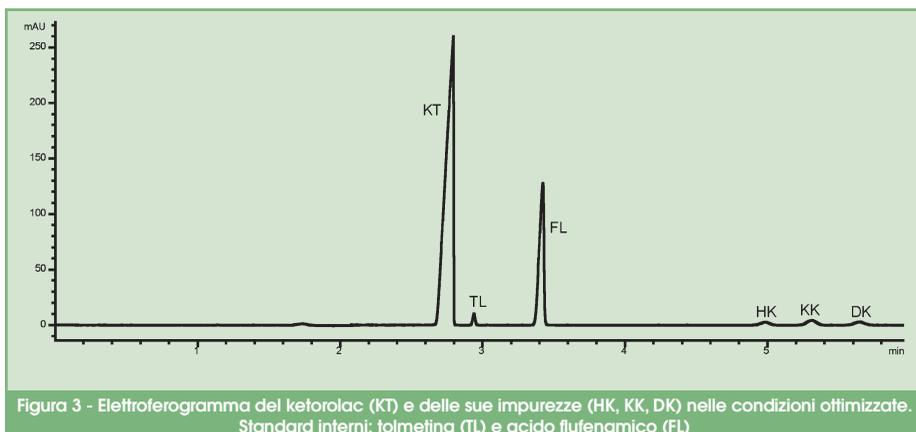
Convalida del metodo MEKC

Dopo la fase di ottimizzazione, il metodo analitico è stato sottoposto al processo di convalida per la determinazione degli analiti nella forma farmaceutica. I parametri analitici considerati sono stati accuratezza, precisione, selettività, limite di rilevabilità, limite di determinazione, linearità, intervallo di linearità, robustezza. Il metodo è risultato convalidato e quindi rispondente allo scopo per cui è stato sviluppato.

Anche in questa fase il disegno sperimentale si è rivelato utile. In generale, il disegno sperimentale nel processo di convalida può essere usato non solo per la valutazione ma anche per l'ottimizzazione di alcuni parametri che non rientrano nei limiti pre-stabiliti (6). In questo caso è stato utilizzato per valutare la robustezza del metodo

Bibliografia

- (1) J. Trigg, S. Wold, Introduction to Statistical Experimental Design, Homepage of Chemometrics, Editorial, August 2002, www.acc.umu.se/~7Etnkjtg/chemometrics/editorial/aug2002.html
- (2) S. Orlandini *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2004, **1032**, 253.
- (3) G.A. Lewis *et al.*, *Pharmaceutical Experimental Design*, Marcel Dekker, New York, 1999.
- (4) R. Todeschini, *Introduzione alla Chemiometria*, EdISES, Napoli, 1998.
- (5) D. Mathieu *et al.*, NEMROD-W, LPRAI sari, Marsiglia.
- (6) S. Furlanetto *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, **377**, 937.



attraverso il relativo test. La robustezza di un procedimento analitico è la sua capacità di non essere influenzato nelle sue prestazioni da piccole ma deliberate variazioni dei parametri ottimizzati e dà un'indicazione sulla sua affidabilità nel suo uso normale. Dallo studio di una superficie di risposta, ottenuta con una strategia di disegno sperimentale in fase di ottimizzazione, è possibile già valutare la zona del dominio sperimentale in cui si evidenzia la massima stabilizzazione della risposta, cioè la massima robustezza. Comunque, in casi complessi come il presente, è sicuramente più opportuno effettuare il test. Questo prevede di stabilire il dominio sperimentale dei fattori, centrato sul loro valore ottimizzato e con un piccolo range di variazione, e di scegliere un'opportuna matrice che consenta di individuare se il cambiamento di livello dei fattori causa una variazione statisticamente significativa della risposta. Nel nostro caso è stata quindi utilizzata una matrice di Plackett-Burman, che permette di ottenere informazioni di questo tipo con un numero di esperimenti estremamente ridotto: con soli otto esperimenti è stato possibile valutare quali erano gli effetti significativi tra i cinque in esame. In

base ai risultati ottenuti è stato necessario inserire un avvertimento cautelativo per R5, su cui piccole variazioni di voltaggio e di concentrazione dell'elettrolita esercitavano un effetto significativo. Inoltre, dai risultati del test è stato possibile definire anche i limiti del *system suitability*.

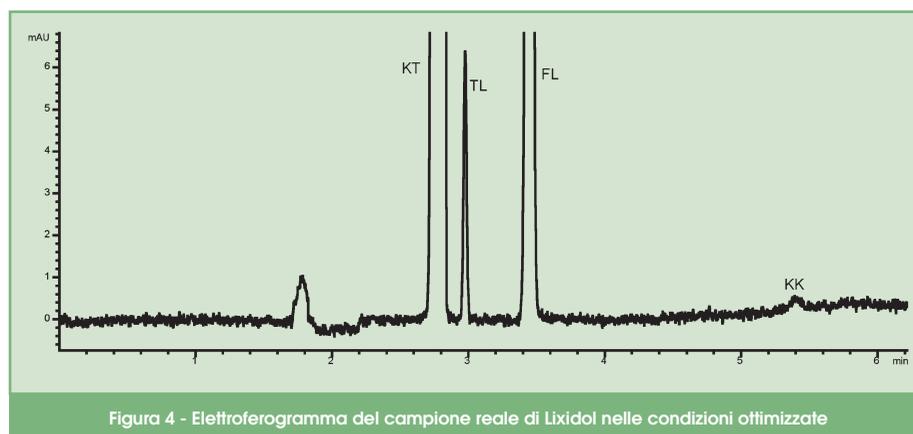
Applicazione del metodo MEKC

Il metodo sviluppato è stato quindi applicato all'analisi di un campione reale di confetti di Lixidol (Roche, Milano), contenenti 10 mg di ketorolac trometamina (Figura 4). Il contenuto in KT è risultato esse-

re in accordo con il dichiarato. Tra le impurezze, è stata evidenziata la presenza del solo KK, a concentrazioni vicine al LOD (0,6 µg/mL, 0,03% p/p). Il metodo si è perciò dimostrato idoneo all'uso di routine nel controllo di qualità della forma farmaceutica.

Conclusioni

Grazie ai progressi informatici e strumentali, come pure all'ampia disponibilità di software commerciali, il disegno sperimentale ha sempre maggiore diffusione. Questa strategia presenta alta versatilità ed ha trovato ampia applicazione in campo farmaceutico, non solo nel settore analitico, per l'ottimizzazione e la convalida di metodi, ma anche nel settore tecnologico, per il disegno e lo sviluppo di formulazioni farmaceutiche. Le sue grandi potenzialità meritano il cambiamento della *forma mentis* del ricercatore, sia in campo accademico che industriale, dall'approccio univariato ad un approccio multivariato. È comunque importante sottolineare che esso è solo uno strumento a sostegno del ricercatore e necessita sia di una opportuna progettazione sia di un opportuno trattamento dei dati sperimentali ottenuti.



Development of a MEKC Method: an Experimental Design Application in Pharmaceutical Analysis

ABSTRACT

In the past 30 years experimental design has become a part of many analytical chemists' storehouse of knowledge and they have found out in this tool the possibility to obtain answers to many optimization issues in an efficient and rational way. In this paper an example of an application of this strategy is presented in the optimization and validation of a MEKC method for the determination of the anti-inflammatory drug ketorolac and its impurities in pharmaceutical dosage form.