



Uniwersytet
Gdański



Katedra Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

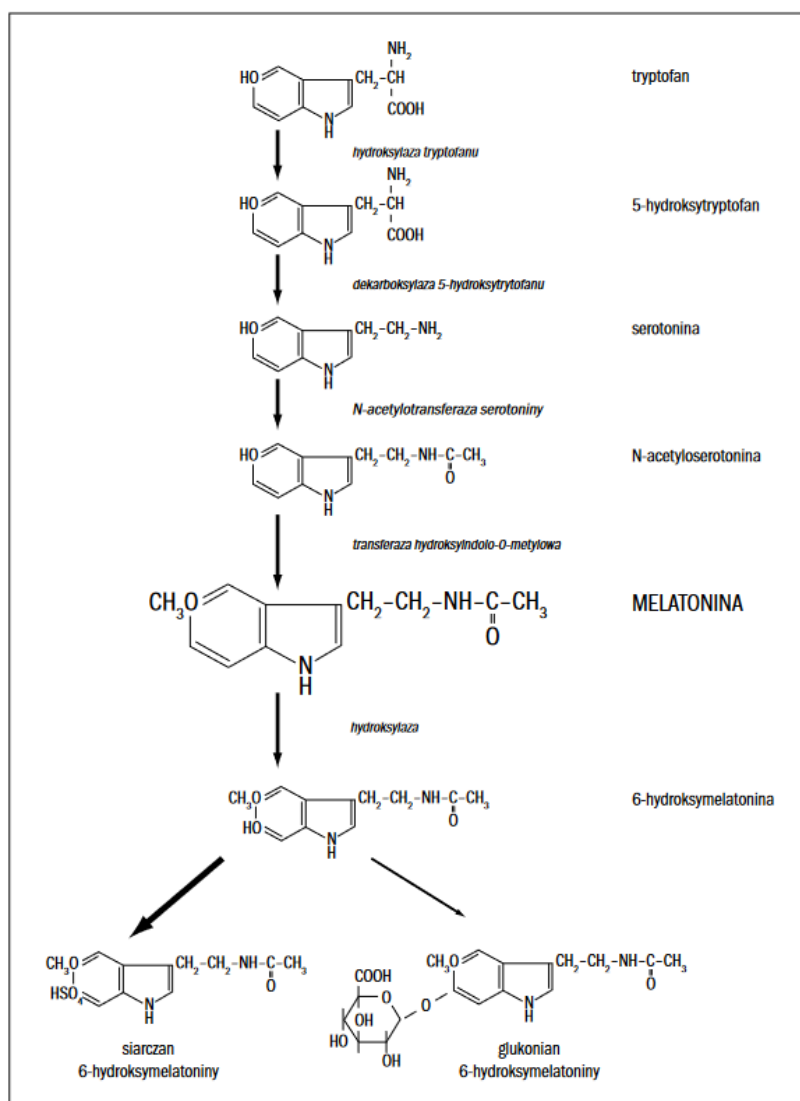
Ćwiczenie 1

Zastosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej do kontroli jakości produktów leczniczych

Gdańsk, 2024

1. Wprowadzenie

Melatonina (*N*-acetylo-5-meto-ksytryptamina) jest hormonem (związkiem indolowym, pochodną tryptofanu) produkowanym głównie przez komórki gruczołowe szyszynki – pinealocyty. Ponadto, niewielkie ilości tego hormonu są także wytwarzane przez siatkówkę i soczewkę oka, nabłonek przewodu pokarmowego i komórki krwi. U ssaków synteza melatoniny zachodzi poprzez jej prekursor – tryptofan a głównym enzymem biorącym udział w tym procesie jest *N*-acetylotransferaza (Rys. 1) [1-3].



Rys.1. Synteza i metabolizm melatoniny [4]

Melatonina jest związkiem dobrze rozpuszczalnym w wodzie i w tłuszczach, ale nie jest ona magazynowana w organizmie. Stężenie melatoniny jest zmienne zarówno w cyklu dobowym, jak również w poszczególnych porach roku. Podstawowym regulatorem wydzielania melatoniny jest cykl światło-ciemność. W ciągu dnia stężenie tego hormonu w surowicy jest małe (10–20 pg/ml), natomiast w nocy wyraźnie zwiększa się, a najwyższe wartości oznaczane są (80–150–200 pg/ml) między godziną 24.00 a 3.00. Ponadto, wykazano, że dobowy rytm wydzielania melatoniny u człowieka zaczyna się pojawiać między 6 a 9 tygodniem życia, następnie obserwowany jest wyraźny wzrost ilości nocnego wydzielania tego hormonu, którego maksimum obserwowane jest między 4 a 7 rokiem życia. W okresie dojrzewania płciowego zaczyna się powolny spadek poziomu wydzielania melatoniny, który postępuje powoli i po osiągnięciu 65–70 roku życia rytm dobowy wydzielania melatoniny prawie całkowicie zanika [5,6].

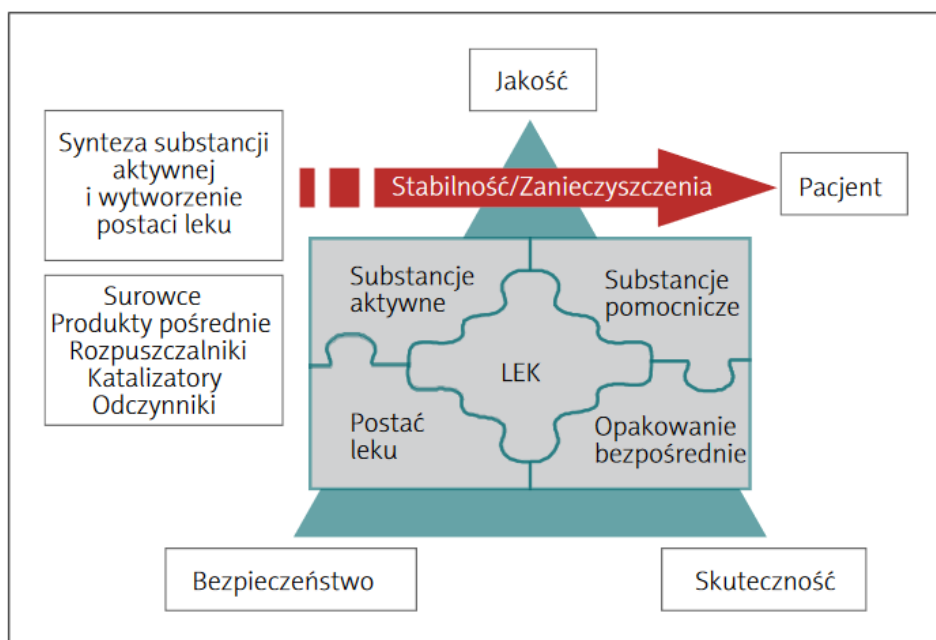
Melatonina uczestniczy w regulacji procesów fizjologicznych u ludzi i zwierząt. Związek ten wykazuje silne działanie antyoksydacyjne. Należy podkreślić, że melatonina charakteryzuje się większą skutecznością w zmiataniu rodnika hydroksylowego ($\text{OH}^{\bullet}$) niż glutation czy też mannitol. Ponadto stwierdzono, że melatonina jest skuteczniejszym wymiataczem wolnych rodników niż powszechnie stosowane w tym celu – witaminy E i C. Wykazano również inne możliwości zastosowania melatoniny, w tym jej pomocniczą rolę w zahamowaniu postępu choroby Alzheimera, korzystne działanie w chorobach układu krążenia (obniżanie ciśnienia krwi), możliwości jej stosowania w różnych typach sezonowych depresji. Wykazano również cytostatyczne działanie melatoniny w niektórych postaciach nowotworów płuc i raka piersi, a liczba publikacji o przeciwnowotworowym działaniu tego związku stale wzrasta [7,8].

Do oznaczania zawartości melatoniny w lekach, produktach roślinnych czy też materiale biologicznym wykorzystuje się: chromatografię gazową ze spektrometrią mas (GC–MS), wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC), elektroforezę kapilarną (CE) oraz metody spektrofotometryczne.

Kontrola jakości leków

Pacjenci, którzy są głównymi użytkownikami leków i produktów leczniczych, nie są praktycznie w stanie ocenić ich jakości. Dlatego też, całkowitą odpowiedzialność za ich jakość oraz zgodność ze specyfikacjami przedstawionymi w dokumentach rejestracyjnych ponoszą

producenci oraz instytucje rządowe, nadzorujące wprowadzanie ich do lecznictwa i kreujące kryteria tej jakości (Rys. 2).



Rys. 2. Podstawowe elementy jakości leków [9]

W państwach Unii Europejskiej rejestracja i dopuszczanie do obrotu produktów leczniczych i wyrobów medycznych związane są bezpośrednio z ich jakością, bezpieczeństwem i skutecznością terapeutyczną. Głównymi dokumentami opisującymi te wymagania są: Dyrektywa 2001/83/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z 6 listopada 2001 r. (Wersja połączona: 21/03/2008) w sprawie wspólnotowego kodeksu odnoszącego się do produktów leczniczych stosowanych u ludzi; Rozporządzenie (WE) nr 726/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z 31 marca 2004 r., ustanawiające wspólnotowe procedury wydawania pozwoleń dla produktów leczniczych stosowanych u ludzi i do celów weterynaryjnych i nadzoru nad nimi. Na poziomie europejskim jakość produktów leczniczych kontrolowana jest przez Sieć Państwowych Laboratoriów Kontroli Produktów Leczniczych (OMCL), koordynowaną przez Europejski Dyrektoriat Jakości Leków (EDQM), agendę Rady Europy. W Polsce rolę takiego laboratorium pełni Narodowy Instytut Leków, w którym decyzją ministra zdrowia z grudnia 2005 roku powołano Narodowe Laboratorium Kontroli Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (NLKPLW MiPB). Kontrola wybranych produktów, jest też wykonywana przez Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Instytut Hematologii, Państwowy

Instytut Weterynarii oraz Instytut Żywności i Żywnienia. Instytuty w systemie ochrony zdrowia realizują w ten sposób określone zadania polityki zdrowotnej państwa. Badania laboratoryjne produktów leczniczych wykonywane są przed i po wprowadzeniu ich do obrotu, w tym sprawdzana jest ich zgodność ze specyfikacjami przedstawionymi w dokumentach rejestracyjnych, we wniosku o dopuszczenie do obrotu lub w oficjalnych dokumentach, takich jak Farmakopea Europejska. Analiza wytycznych dotyczących jakości leków pozwala wnioskować, że obecnie najczęściej uwagi przywiązuje się do stabilności i zanieczyszczenia substancji aktywnych, źródła ich pochodzenia oraz analizę ryzyka w całym procesie wytwarzania farmaceutycznego. W przemyśle farmaceutycznym takim ryzykiem może być wytworzenie wadliwego produktu leczniczego, który może spowodować istotne problemy zdrowotne u pacjentów. Z kolei w laboratorium kontrolnym jako ryzyko wskazuje się nieprawidłowy wynik analizy, na którego podstawie podejmowane są istotne decyzje np. o wycofaniu produktu z obrotu [9].

Wyróżnia się dwie grupy czynników ryzyka:

1. znane czynniki ryzyka, często też określane jako znane nieznane – czyli czynniki ryzyka, które zostały zidentyfikowane i przeanalizowane co pozwala na przygotowanie planu działań zapobiegawczych i minimalizujących wpływ ryzyka na przedsięwzięcie już po jego wystąpieniu.
2. nieznane czynniki ryzyka, określane też często jako nieznane nieznane – czyli ryzyko, którego identyfikacja, a tym samym, także zarządzanie nim nie jest możliwe. Nieprzewidywalność czynników ryzyka tego rodzaju utrudnia opracowywanie planów awaryjnych.

Analiza ryzyka jest systematyczną procedurą, na którą składają się określenie zagrożenia i prawdopodobieństwo przekształcenia się go w określonych okolicznościach w stan krytyczny (oszacowanie ryzyka), ocena zastosowania wszelkich możliwych sposobów do osiągnięcia należytego poziomu zabezpieczenia (zarządzanie ryzykiem), wymiana informacji między wszystkimi zainteresowanymi stronami: decydentami, kontrolującymi, konsumentami i producentami w celu wyjaśnienia powodów i uzasadnienia proponowanych metod zarządzania (komunikacja ryzyka). Oprócz oceny stabilności istotnym zagrożeniem dla jakości leków są zanieczyszczenia, w tym głównie zanieczyszczenia technologiczne, rozkładowe, pozostałości rozpuszczalników, katalizatorów i metali ciężkich, których dopuszczalne pozostałości są dokładnie regulowane przez wytyczne i monografie farmakopealne (*Control of Impurities of Pharmacopoeial Substances*, CPMP/QWP/ 1529/04, 2004; *Impurities: Residual Solvents* (ICH Q3C), CPMP/ICH/ 283/95-ICH Q3C (R3) 1998; *Guideline on the specification limits residues of metal catalysts or metal*

reagent, EMEA/CHMP/ SWP/4446/2000, 2008; <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/swp/444600.pdf>). Ponadto, w ostatnich latach zarówno leki objęte ochroną patentową jak i leki odtwórcze (generyczne) stają się w coraz większym stopniu celem fałszerzy. Nielegalna produkcja i nielegalna podaż sfałszowanych produktów leczniczych, wyrobów medycznych i suplementów diety, szczególnie w obrocie pozaaptecznym stale wzrasta. Dostępne są również udokumentowane informacje o hospitalizacjach i zgonach osób, które stosowały preparaty niewiadomego pochodzenia, z nielegalnych źródeł [9].

2. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest analiza jakościowa i ilościowa melatoniny w produktach leczniczych metodą krzywej kalibracyjnej z wykorzystaniem techniki HPLC.

2.1. Wykonanie ćwiczenia

- Z wodnego roztworu podstawowego kofeiny o stężeniu **1 mg/ml** przygotować 6 roztworów roboczych o stężeniach 5, 10, 25, 50, 75, 100 µg/ml.
- Wykonać analizę roztworu roboczego melatoniny o stężeniu 50 µg/ml przy różnych długościach fali, dokonać wyboru analitycznej długości fali.
- Trzykrotnie wykonać analizy HPLC-UV 6-ciu roztworów roboczych melatoniny.
- Wykreślić krzywą kalibracyjną, w tym równanie krzywej i współczynnik R^2 .
- Wykonać ekstrakcję melatoniny z trzech produktów leczniczych, w tym celu zważyć 1 tabletkę każdego z trzech produktów leczniczych i wykonać ekstrakcję 10 ml metanolu w łaźni ultradźwiękowej przez 10 min. Otrzymany ekstrakt przefiltrować przez filtr strzykawkowy. Biorąc pod uwagę, że przewidywana zawartość melatoniny w badanych produktach leczniczych (tabletki) mieści się w zakresie od 0 do 1 mg dokonać odpowiedniego rozcieńczenia ekstraktów tak aby oznaczona zawartość w ekstrakcie mieściła się w zakresie krzywej kalibracyjnej.
- Wyznaczyć zawartość melatoniny w produktach leczniczych korzystając z równania krzywej kalibracyjnej. Uzyskaną wartości podać w mg/tabletkę i porównać z zawartością udostępnioną przez producenta leku.



Warunki analizy HPLC-UV

- Kolumna Hypersil Gold C18_{aq}, 150x4 mm, 3 μ m;
- Faza ruchoma: (B)Acetonitryl/(A)Woda;
- Warunki izokratyczne: 30B:70A, v/v
- Przepływ fazy ruchomej: 0,8 ml/min

2.2. Opracowanie wyników

- Wykreślić krzywą kalibracyjną, w tym równanie krzywej i współczynnik R^2 , precyzję i dokładność. Wyznaczyć instrumentalną granicę oznaczalności (LOQ, μ g/ml) i wykrywalności metody (LOD, μ g/ml),
- Wyznaczyć zawartość melatoniny w produktach leczniczych korzystając z równania krzywej kalibracyjnej. Uzyskane wartości podać w mg/tabletkę i porównać z zawartością udostępnioną przez producenta.

3. Odczynniki i sprzęt laboratoryjny

- Roztwór podstawowy melatoniny w metanolu o stężeniu 1 mg/ml
- metanol o czystości do HPLC
- metanol do mycia strzykawki,
- cylinder miarowy poj. 10 mL - 2 szt.,
- cylinder miarowy poj. 250 mL - 2 szt.,
- pipety o poj. 5 mL 4 szt.,
- pipety o poj. 2 mL 2 szt.,
- zlewka o pojemności 25 mL 3 szt.,
- strzykawki o poj. 50 i 100 μ L
- buteleczki z ciemnego szkła o poj. 2 mL 15 szt.,
- buteleczki z ciemnego szkła o poj. 4 mL 2 szt.,
- kolba miarowa o poj. 25 mL 3 szt.,

Literatura

1. Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*. 1994; 13:1177-1185.
2. Arendt J. Melatonin and the mammalian pineal gland. Chapman and Hall, London, 1995.



3. Vanhoutte PM, Humphrey PP, Spedding M. X. International Union of Pharmacology recommendations for nomenclature of new receptor subtypes. *Pharmacol Rev.* 1996; 48:1-2.
4. Karasek M, Lewiński A, Reiter RJ. Melatonina: znaczenie kliniczne i zastosowanie terapeutyczne. *Endokrynol. Pol./Pol. J. Endocrinol.* 2001, 52, 81-100.
5. Kennaway DJ., Stamp GE., Goble FC. Development of melatonin production in infants and the impact of prematurity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1992, 75, 367-369.
6. Waldhauser F, Kovacs J, Reiter E. Age-related changes in melatonin levels in humans and its potential consequences for sleep disorders. *Exp. Gerontol.* 1998, 33, 759-772
7. Beyer CE., Steketee JD., Saphier D. Antioxidant properties of melatonin – an emerging mystery. *Biochem. Pharmacol.* 1998, 56, 1265-1272.
8. Brusco LI, Marquez M, Cardinali DP. Melatonin treatment stabilizes chronobiologic and cognitive symptoms in Alzheimer's disease. *Neuroendocrinol. Lett.* 1998, 19, 111-115
9. Fijałek Z, Sarna K. Zarządzanie ryzykiem w wytwarzaniu i kontroli jakości produktów leczniczych. *Jakość Leków*, 2009, 65, 305-310