

DOSAGGIO DEL TADALAFIL IN COMPRESSE FORMULATE TRAMITE QNMR DA BANCO

Introduzione

La risonanza magnetica nucleare (NMR) è una tecnica di caratterizzazione estremamente potente che viene spesso utilizzata per la ricerca farmaceutica per identificare nuovi composti, valutare la purezza e caratterizzare e ottimizzare le reazioni chimiche, sia online (con una cella a flusso) che offline o at-line (per NMR reazioni in provetta o analisi di aliquote). Sebbene meno comune, è stata anche stabilita come una tecnica utile nel settore farmaceutico per analisi quantitative di routine. [1,2,3,4] L’NMR da banco è emersa come una tecnologia accessibile per estendere l’uso della spettroscopia NMR alle start-up e alle PMI farmaceutiche, oltre a fornire un’alternativa facile da usare, compatta e automatizzabile per consentire al qNMR di essere incorporato direttamente nei laboratori di controllo qualità e utilizzato dai tecnici.

In questo contesto, descriviamo l’uso dell’NMR da banco per la conferma della struttura di un ingrediente farmacologico attivo; valutazione dei prodotti di degradazione e/o delle impurità, verso la valutazione dell’efficacia e delle prestazioni di questa tecnica per il test di uniformità del dosaggio e del contenuto.

L’NMR presenta molti vantaggi rispetto ai metodi comunemente usati, come la titolazione, la spettroscopia a infrarossi (IR), la spettroscopia Raman e la cromatografia. È chimicamente specifico, non mirato, non distruttivo, intrinsecamente qualitativo senza calibrazione e richiede una preparazione del campione molto semplice. Non richiede la preparazione di serie di diluizioni, non consuma grandi quantità di solvente, né richiede una sostanza standard autentica [5] per l’analisi.

In questa nota applicativa, valutiamo la purezza del tadalafil acquistato come standard di riferimento (Figura 1a) utilizzando ^1H NMR ed eseguiamo il test utilizzando due tadalafil disponibili in commercio. Questi farmaci sono venduti con il marchio Cialis e il nome generico Apo-Tadalafil.

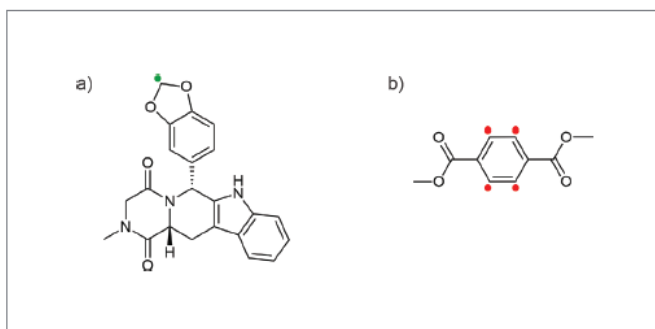


Figura 1: a) Struttura del tadalafil e b) struttura del dimetil tereftalato (DMT). I cerchi verde e rosso rappresentano i protoni oggetto di valutazione in questo studio.

Questi farmaci sono usati per trattare l’iperplasia prostatica benigna, [6] la disfunzione erettile, [7] e l’ipertensione arteriosa polmonare [8]. Il dimetil-tereftalato (Figura 1b) è stato utilizzato come calibrante interno in questa analisi NMR quantitativa. È stato scelto perché almeno una delle sue risonanze ^1H non si

sovrappone a quelle risonanze del composto target e i suoi valori T1 sono più brevi di altri possibili standard interni qNMR. L'esempio qui presentato è specifico per il settore farmaceutico, ma il metodo qNMR è generale e può essere convalidato per analisi di routine in qualsiasi campo in cui la determinazione della purezza è fondamentale per il processo.

Procedura sperimentale: determinazione della purezza standard di riferimento del tadalafil

Il composto standard di riferimento (tadalafil, 11,78 mg) Lotto n.: LRAB8867 e un calibrante interno certificato (dimetil tereftalato (DMT), 2,73 mg) Lotto n. : BCBT9974, sono stati pesati accuratamente in una fiala e sono stati aggiunti 600 µL di DMSO-d6. La soluzione è stata miscelata utilizzando un agitatore a vortice fino a quando il campione e lo standard interno non sono stati completamente dissolti. La risultante soluzione limpida è stata trasferita in un tubo NMR da 5 mm e lo spettro 1H NMR è stato ottenuto dopo che i valori di T1 sono stati determinati. Il valore T1 per il segnale DMT a 8,08 ppm è 2,82 se il valore per il segnale tadalafil a 5,92 ppm è 0,53s. Tutti i composti sono stati acquistati da Sigma-Aldrich e utilizzati senza ulteriore purificazione. Gli spettri sono stati ottenuti a 32°C utilizzando uno spettrometro NMR da banco Nanalysis 60PRO a una frequenza protonica di 60 MHz (1.418 tesla). Gli esperimenti sono stati eseguiti con i seguenti parametri di acquisizione: numero di punti complessi, 8192; larghezza dello spettro, 24 ppm; numero di scansioni, 32; ritardo di scansione, 20 s; centro spettrale, 8,03 ppm; tempo di acquisizione, 5,57 s; Durata dell'impulso di 90 °, 15,1 µs. Ogni spettro è stato elaborato applicando il riempimento zero, numero di punti con riempimento zero uguale a 65536, sono state eseguite la correzione di fase e della linea di base, la moltiplicazione della finestra di Lorentz a Gauss è stata applicata al FID (allargamento della linea esponenziale (lb) e allargamento della linea gaussiana (gb) sono stati impostati rispettivamente a -0,1 e 0,3 Hz). [9] L'acquisizione dello spettro è stata eseguita in quintuplicato.

Risultati e discussione: determinazione della purezza del composto standard di riferimento del tadalafil

La purezza dell'analita P_x è stata calcolata utilizzando la seguente equazione (1):

$$P_x = \frac{A_x}{A_{DMT}} * \frac{N_{DMT}}{N_x} * \frac{M_x}{M_{DMT}} * \frac{m_x}{m_{DMT}} * P_{DMT} \quad (1)$$

Dove A_x è il valore integrale del segnale a 5,92 ppm che appartiene al tadalafil; A_{DMT} è il valore integrale del segnale a 8,08 ppm che appartiene a D_{MT}; N_{DMT} e N_x corrispondono rispettivamente al numero di giri di DMT e tadalafil; M_x e M_{DMT} sono rispettivamente il peso molecolare di tadalafil e D_{MT}; m_x è la massa ponderata del tadalafil; e m_{DMT} e P_{DMT} sono rispettivamente la massa ponderata e la purezza riportata di DMT10.

	A _x	A _{DMT}	N _{DMT}	N _x	M _x (g.mol ⁻¹)	M _{DMT} (g.mol ⁻¹)	m _x (mg)	m _{DMT} (mg)	P _{DMT} [#] %	P _x %
1	5228386.44	4884533.93	4	2	389.4	194.186	2.73	11.78	99.95	99.4
2	5224447.26	4858522.55	4	2	389.4	194.186	2.73	11.78	99.95	99.9
3	5231152.01	4866928.42	4	2	389.4	194.186	2.73	11.78	99.95	99.9
4	5245944.95	4870028.1	4	2	389.4	194.186	2.73	11.78	99.95	100.1
5	5215474.05	4883227.2	4	2	389.4	194.186	2.73	11.78	99.95	99.2

#Value reported by the commercial supplier¹⁰

Tabella 1: Determinazione della purezza del composto di riferimento del tadalafil (X) utilizzando il dimetiltereftalato (DMT) come calibratore interno.

La regione di integrazione preimpostata applicata a ciascun segnale nella Figura 2 era: da 8,2791 a 7,9320 ppm per il DMT e da 6,0283 a 5,7700 ppm per il composto X. Sostituendo i valori variabili dell'equazione 1 con i valori riportati nella tabella 1, un valore di purezza P_x di Si ottiene $99,7 \pm 0,4$. Il valore calcolato concorda con l'intervallo di valori riportato dall'azienda fornitrice [11] ($99,7 \pm 0,1$).

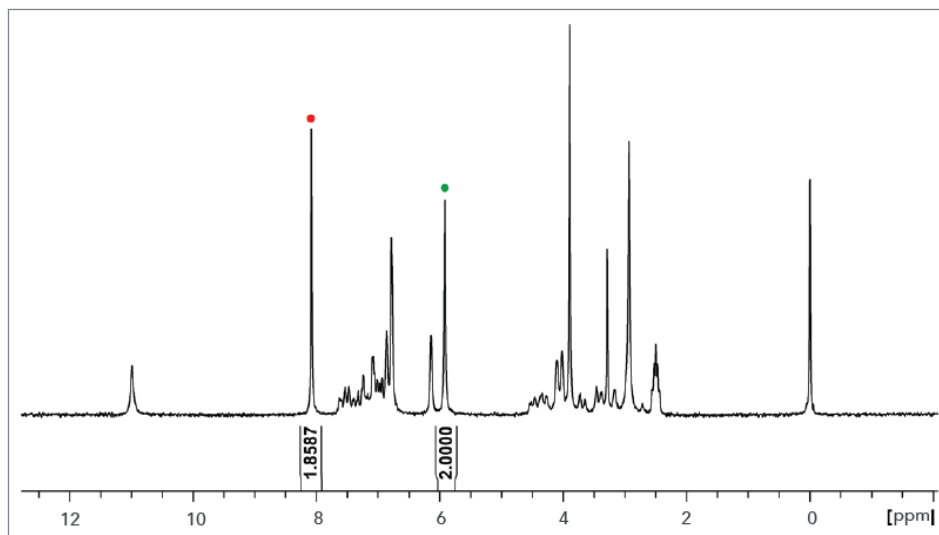


Figura 2. Spettro ^1H NMR di una miscela di tadalafil e DMT in DMSO-d6 acquisito utilizzando un banco di analisi Nanalysis 60PRO. I cerchi verde e rosso rappresentano i protoni studiati di tadalafil e DMT, rispettivamente.

Procedura sperimentale: test Cialis e Apo-Tadalafil

I test di dosaggio sono stati eseguiti pesando e polverizzando cinque compresse di ciascun farmaco. Le scatole dei farmaci indicano che ogni compressa contiene 20 mg di tadalafil. Una porzione, che rappresenta circa 20 mg del composto attivo, di ciascuna polvere ben miscelata (210,91 mg per Cialis e 239,07 mg per Apo-Tadalafil) e il composto calibrante, DMT (2,25 mg per Cialis e 3,6 mg per Apo-Tadalafil), sono stati pesati su una bilancia analitica (Mettler-Toledo MS105DU), seguita dall'aggiunta di DMSO-d6 (950 μL). Le due fiale contenenti le miscele sono state vortexate per 5 minuti, seguite da sonicazione per altri 20 minuti.

Dopo la centrifugazione, le soluzioni sono state filtrate e aggiunte a una provetta NMR standard da 5 mm. [5] I parametri di acquisizione e di elaborazione utilizzati in ciascuno spettro ^1H NMR erano gli stessi descritti nella procedura per la determinazione della purezza.

Risultati e discussione: test Cialis e Apo-Tadalafil Assay

Per determinare la massa media di tadalafil in ciascuna compressa è stata utilizzata l'equazione 2:

$$m_x = \frac{A_x}{A_{DMT}} * \frac{N_{DMT}}{N_x} * \frac{M_x}{M_{DMT}} * \frac{m_{DMT}}{m_{powder}} * P_{DMT} * T \quad (2)$$

Dove m_{powder} è la massa ponderata del campione di polvere della compressa prelevato per il test del dosaggio e T è il peso medio della compressa. Il significato di qualsiasi altro parametro è identico a quello descritto nell'equazione 1.

	A_x	A_{DMT}	N_{DMT}	N_x	M_x (g.mol ⁻¹)	M_{DMT} (g.mol ⁻¹)	m_{DMT} (mg)	m_{powder} (mg)	$P_{DMT}^{\#}$	T (g)	m_x (mg)
1	278193.95	217851.59	4	2	389.4	194.18	2.25	210.91	0.9995	0.36191	19.8
2	277063.35	212686.38	4	2	389.4	194.18	2.25	210.91	0.9995	0.36191	20.2
3	273939.14	218779.56	4	2	389.4	194.18	2.25	210.91	0.9995	0.36191	19.4
4	277771.38	216568.53	4	2	389.4	194.18	2.25	210.91	0.9995	0.36191	19.9
5	276389.04	213979.22	4	2	389.4	194.18	2.25	210.91	0.9995	0.36191	20.0

#Value reported by the commercial supplier¹⁰

Tabella 2: Determinazione della massa media del tadalafil in compresse Cialis utilizzando dimetil tereftalato (DMT) come composto di calibrazione.

	A_x	A_{DMT}	N_{DMT}	N_x	M_x (g.mol ⁻¹)	M_{DMT} (g.mol ⁻¹)	m_{DMT} (mg)	m_{powder} (mg)	$P_{DMT}^{\#}$	T (g)	m_x (mg)
1	261260.33	314656.41	4	2	389.4	194.18	3.6	239.07	0.9995	0.41069	20.6
2	245126.49	301275.86	4	2	389.4	194.18	3.6	239.07	0.9995	0.41069	20.2
3	248098.42	304813.33	4	2	389.4	194.18	3.6	239.07	0.9995	0.41069	20.2
4	247394.95	303285.38	4	2	389.4	194.18	3.6	239.07	0.9995	0.41069	20.2
5	246545.00	300803.85	4	2	389.4	194.18	3.6	239.07	0.9995	0.41069	20.3

#Value reported by the commercial supplier¹⁰

Tabella 3: Determinazione della massa media di tadalafil nelle compresse di Apo-Tadalafil utilizzando dimetiltereftalato (DMT) come composto di calibrazione.

L'area relativa dei segnali scelti è stata determinata applicando una regione di integrazione preimpostata da 8.1964 a 7.9930 ppm per il segnale DMT e da 5.9943 a 5.8340 ppm per il segnale di tadalafil (Figura 2). Sostituendo i valori riportati nelle Tabelle 2 e 3 per le rispettive variabili nell'Equazione 2, è stata ottenuta una massa media di $19,8 \pm 0,3$ mg per compressa per Cialis e $20,3 \pm 0,2$ mg per ciascuna compressa di Apo-Tadalafil. Entrambi i valori rientrano nell'intervallo accettato dalla monografia USP per il tadalafil, riportato come 20 ± 2 mg, nonché con i dati di campo elevato, che sono stati determinati come 20,0 mg e 20,9 mg, rispettivamente per Cialis e Apo-Tadalafil.

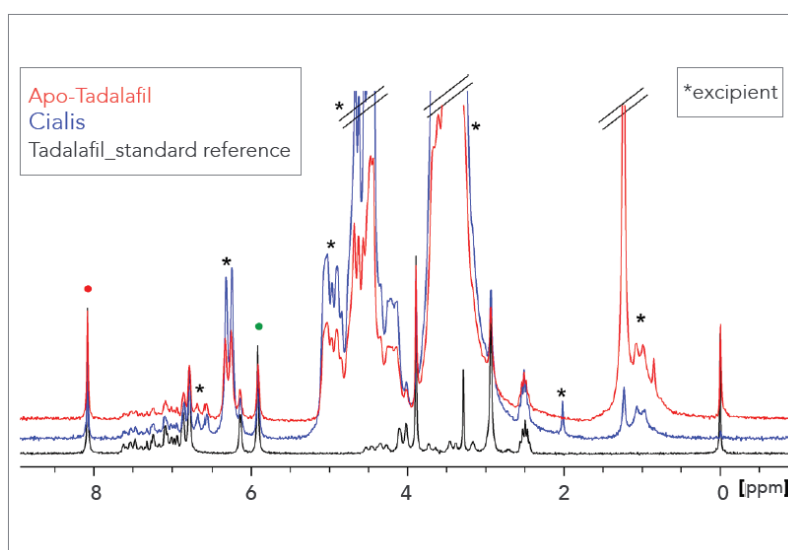


Figura 3. Spettro ¹H NMR dello standard di riferimento del tadalafil in DMSO-d₆ (nero); Spettro ¹H NMR dell'estrazione delle compresse di Cialis con DMT in DMSO-d₆ (blu); Spettro ¹H NMR dell'estrazione di compresse di Apo-Tadalafil con DMT in DMSO-d₆ (rosso). Tutti gli spettri sono stati acquisiti in un Nanalysis 60PRO.

Oltre alle informazioni quantitative ottenute nei test di dosaggio, è possibile osservare un'impronta digitale degli eccipienti e utilizzarla per il controllo di qualità quando si utilizza l'analisi NMR (Figura 3). Per il caso studiato, i fornitori hanno segnalato i seguenti eccipienti: croscarmellosa sodica, idrossipropilcellulosa, idrossipropilmetilcellulosa, ossido di ferro, lattosio monoidrato, magnesio stearato, cellulosa microcristallina, sodio lautil solfato, talco, biossido di titanio e triacetina per Cialis e croscarmellosa sodica, lattosio monoidrato, magnesio stearato, cellulosa microcristallina, sodio lautil solfato, biossido di titanio, ossido di ferro rosso, ossido di ferro giallo, ipromellosa, polossamero e polietilenglicole per Apo-Tadalafil.

Conclusione

L'NMR da banco è stato utilizzato con successo per valutare la purezza del tadalafil ed eseguire il test di analisi di due diverse compresse contenenti tadalafil come ingrediente attivo. Come altri metodi, è necessaria una fase di preparazione del campione prima dell'acquisizione e della valutazione dei dati. Tuttavia, con NMR, i dati possono essere acquisiti in pochi minuti. Inoltre, la valutazione dei dati è semplice poiché l'area del picco in NMR è direttamente proporzionale al numero di protoni presenti nella molecola. Il calibrante interno, che ha una concentrazione e una struttura note, ha il ruolo di fornire uno o più segnali in aree che possono essere utilizzate per la quantificazione dell'analita target.

Questo studio indica quanto potente possa essere la NMR da banco nell'analisi del controllo di qualità e come possa essere utilizzata come metodo complementare in molte fasi della valutazione del farmaco. Una volta che il metodo è stato sviluppato e convalidato, i risultati possono essere ottenuti rapidamente, con un basso volume di solvente di scarto, senza che uno specialista esegua il campione o valuti i dati, senza menzionare la ricchezza di informazioni ottenute.

Bibliografia

- [1] Jaki, B. U.; Bzhelyansky, A.; Pauli, G. F. *Magn. Reson. Chem.* 2020; 1–9. <https://doi.org/10.1002/mrc.5099>.
- [2] Hanna, G. M. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1984, 67, 222.
- [3] Hanna, G. M.; Lau-Cam, C. A. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1988, 14, 43.
- [4] Hanna, G. M.; Lau-Cam, C. A. *J. Assoc. Of. Anal. Chem.* 1988, 71, 1118.
- [5] Yang, Q.; Qiu, H.; Guo, W.; Wang, D.; Zhou, X.; Xue, D.; Zhang, J.; Wu, S.; Wang, Y. *Molecules* 2015, 20, 12114.
- [6] Hatzimouratidis, K. *Ther. Adv. Urol.* 2014, 6, 135.
- [7] Coward, R. M.; Carson, C. C. *Ther. Clin. Risk Manag.* 2008, 4, 1315.
- [8] Henrie, A. M.; Nawarskas, J. J.; Anderson, J. R. *Core Evid.* 2015, 10, 99.
- [9] Monakhova, Y. B.; Diehl, B. W. *Magn. Res. Chem.* 2017, 55, 996.
- [10] <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/CertOfAnalysisPage.do?symbol=PHR1810&LotNo=LRAB8867&brandTest=SIAL&returnUrl=%2Fproduct%2FSIAL%2FPHR1810> (viewed November 16, 2020)
- [11] <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/CertOfAnalysisPage.do?symbol=07038&LotNo=BCBT9974&brandTest=SIAL&returnUrl=%2Fproduct%2FSIAL%2F07038> (viewed November 16, 2020)