

Qualitative and quantitative determination of one process-related impurity of Dapagliflozin Propandiol Monohydrate as raw material

Dr. Mohammad Haroun*

Dr. Youssef Alahmad**

Ali Ismail***

(Received 16 / 1 / 2022. Accepted 21 / 6 / 2022)

□ ABSTRACT □

A novel, simple, sensitive and less time consumption RP-HPLC has been developed and validated for impurity profiling of dapagliflozin propandiol monohydrate as raw material. The method used BDS Hypersil C18 (150mm, 4.6mm, 5 μ m). The mobile phase consisted of A (Phosphate Buffer adjusted pH to 3.2 using orthophosphoric acid) and B (Acetonitrile). Gradient elution system has been used with 1mL/min flow rate. Detection was carried out using PDA at 240nm. The results of this method showed the presence of an impurity exceeding 0.1% in one of the samples marketed for the active substance then this impurity was isolated by preparative chromatography technique and its structure was determined using FTIR spectroscopy, H1-NMR, C13-NMR spectroscopy, and MS mass spectrometry. Isolated impurity has been identified as dapagliflozin tetraacetate, which is one of the intermediate products in the preparation of this active pharmaceutical ingredient (API).

Keywords: Dapagliflozin Propandiol, Impurity, Profiling, process-related, NMR, Preparative chromatography, RP-HPLC.

*Assistant Professor - Faculty of Pharmacy- Tishreen University. mohammad_haroun@yahoo.fr

** Assistant Professor - Faculty of Pharmacy- Al-Baath University. yalahmad@albaath-univ.edu.sy

***Ph. D Student - Faculty of Pharmacy- Tishreen University. ali.ismail@tishreen.edu.sy

التحديد الكيفي والكمي لشائبة ذات علاقة بالبنية لداباغليفلوزين بروباندول مونوهيدرات في المادة الأولية الخام

د. محمد هارون*

د. يوسف الأحمد**

علي اسماعيل***

(تاريخ الإيداع 16 / 1 / 2022. قُبِلَ للنشر في 21 / 6 / 2022)

□ ملخص □

تم تطوير وتحقق من مصدوقية طريقة كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء ذات طور عكوس RP-HPLC جديدة وبسيطة وحساسة وأقل استهلاكاً للوقت لتعيين مرتسم شوائب داباغليفلوزين بروباندول مونوهيدرات كمادة أولية. وتم التحقق من مصدوقيتها وفق توصيات المؤتمر الدولي للمواءمة ICH. استخدمت الطريقة عمود BDS Hypersil C18 (طول 150 ملم وقطر داخلي 4.5 ملم وأبعاد الأجزاء 5 ميكرومتر) استخدم طور متحرك عبارة عن مزيج من A (وقاء فوسفاتي مضبوط درجة الحموضة حتى 3.2 باستعمال أورثوفوسفوريك) و B (أسيتونتريل) وطبق نظام الشطف المتدرج بمعدل حقن 1 مل/د وجرى الكشف باستخدام PDA عند طول موجة 240 نانومتر. أظهرت نتائج الطريقة وجود شائبة في إحدى العينات التجارية للمادة المذكورة تتجاوز نسبتها 0.1%، وتم عزلها بتقنية الكروماتوغرافيا التحضيرية وتحديد بنيتها باستخدام مطيافية الأشعة تحت الحمراء FTIR ومطيافية الرنين النووي المغناطيسي H1-NMR و C13-NMR ومطيافية الكتلة MS. تم استعراف الشائبة على أنها Dapagliflozin tetraacetate أحد المنتجات الوسيطة في تحضير هذه المادة الفعالة صيدلانياً.

الكلمات المفتاحية: داباغليفلوزين بروباندول، مرتسم الشوائب، شائبة اصطناع، الرنين النووي المغناطيسي، الكروماتوغرافيا التحضيرية، RP-HPLC.

*أستاذ مساعد - كلية الصيدلة - جامعة تشرين - سورية. mohammad_haroun@yahoo.fr

**أستاذ مساعد - كلية الصيدلة - جامعة البعث - سورية. yalahmad@albaath-univ.edu.sy

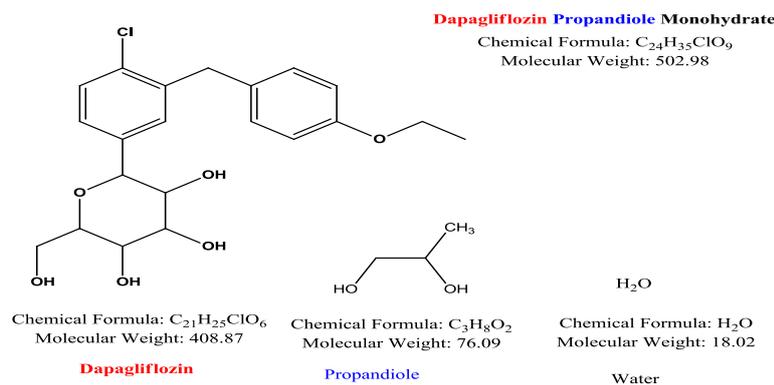
***طالب دراسات عليا (دكتوراه)-كلية الصيدلة - جامعة تشرين - سورية. ali.ismail@tishreen.edu.sy

مقدمة:

يعتبر ضمان فاعلية ومأمونية الأدوية الهدف الأساسي للتشريعات الصحية الدولية [1-2]، ولبلوغ هذا الهدف يجب تحديد المواد غير المرغوبة والتي تسمى بالشوائب Impurities بشكل كفي وكمي والتي قد تكون معروفة الهوية Identified أو غير معروفة Unidentified. صنفت الدلائل الإرشادية الشوائب إلى ثلاثة أصناف رئيسة وهي الشوائب العضوية والشوائب غير العضوية وبقايا المذيبات. يسمى المجهود التحليلي لتعيين محتوى المواد الدوائية الفعالة والأشكال الصيدلانية من هذه الشوائب بـ مرتسم الشوائب. تختلف مرتسمات الشوائب كفيًا وكميًا للمادة نفسها الموردة من مصادر مختلفة باختلاف عوامل عدة، مثل: مصدر المواد الأولية وطريقة التصنيع وعمليات التنقية وشروط الحفظ وعمليات التعبئة وعمليات الصياغة [3].

يعتبر داباغليفلوزين مثبط للناقل المشترك صوديوم غلوكوز من النمط الثاني Sodium Glucose Cotransporter Type 2 (SGT2) Inhibitor المسؤولة عن عود الامتصاص الكلوي للغلوكوز، حيث تقوم هذه الناقل بنقل الغلوكوز عبر الغشاء إلى داخل الخلايا مستخدمة مدروج تركيز شوارد الصوديوم. وتؤدي هذه العملية إلى تفعيل مضخة Na⁺/K⁺ ATPase التي تقوم بدورها بنقل ثلاثة أيونات صوديوم إلى الدم مقابل جلب شاردتي بوتاسيوم إلى خارج الدم وأول ترخيص لداباغليفلوزين كان باسم Forxiga® وهو مضغوطات ملبسة بالفيلم عيار 5 و 10 ملغ لصالح شركة AstraZeneca [4]. أوصت وكالة الدواء الأوروبية European Medicines Agency EMA في 2019/2/1 باعتماد دواء داباغليفلوزين كأول دواء فموي على الإطلاق يضاف لخطة علاج مريض السكري النمط الأول بالإضافة للاستطباب الأساسي للدواء لعلاج الداء السكري من النمط الثاني [5-6]. كما منحت FDA في العام 2019 الموافقة على استخدامه عند مرضى الفشل القلبي Heart Failure مع تراجع الكسر القذفي Reduced ejection fraction [7].

يتوفر داباغليفلوزين على شكل Solvate hydrate وذلك بمزجه مع 1,2 propandiol و جزيئة ماء بنسبة (1:1:1) ويكون بشكل مسحوق بلوري أبيض ويمتلك الوزن الجزيئي 503.0 g.mol⁻¹ والصيغة الكيميائية المبينة في الشكل (1).



الشكل (1) الصيغة الكيميائية المنشورة لداباغليفلوزين بروبانديول مونوهيدرات

غالباً ما يجري تطوير طرائق استشرابية باستعمال الاستشراب السائل عالية الأداء HPLC وكاشف الأشعة فوق البنفسجية UV لفصل الشوائب عن المادة الدوائية، وعن بعضها بعضاً، ثم يستعان بتقانة الاستشراب السائل رفيع الإنجاز التحضيرية HPLC preparative لعزل هذه الشوائب، ومن ثم تحديد بنية هذه الشوائب بالاعتماد بشكل أساسي على الرنين النووي المغناطيسي 1H , ^{13}C NMR، مطيافية الكتلة MS، وفي العديد من الحالات تستعمل مطيافية الأشعة تحت الحمراء FT-IR، وكذلك يجري تطبيق مطيافية الأشعة فوق البنفسجية ومقياس انعراج الأشعة السينية X-ray diffractometry في عدد محدود من الحالات [8-11]

تأولت القليل من الدراسات تحليل شوائب هذا المركب الحديث فقد نُشرت دراسة مرجعية عن الطرائق التحليلية المستخدمة في تعيين داباغليفلوزين كمادة فعالة وضمن الأشكال الصيدلانية باستخدام طرائق طيفية واستشرابية وطرائق مؤشر للثبات [12]. بينما نُشرت طريقة تحليلية لتعيين داباغليفلوزين بوجود مجموعة من الشوائب ضمن المضغوطات الملبسة والتي استخدمت الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء ذات الطور العكوس RP-HPLC وطور متحرك مزيج مؤلف من A (وقاء فوسفاتي بدرجة حموضة 6.5) و B (ماء: أسيتونتريل بنسبة 10:90) ونظام شطف متدرج بمعدل تدفق 1 مل/د والكشف عند طول موجة 245nm، واستغرق التحليل وقتاً طويلاً حوالي 75 دقيقة [13].

يهدف هذا البحث إلى تطوير طريقة تحليلية HPLC جديدة أقل استهلاكاً للوقت وأكثر دقة في عزل مركبات ذات بنية مشابهة لداباغليفلوزين بروبانديول مونوهيدرات والتحقق من مصدقيتها وفق توصيات المؤتمر الدولي للموامة [14]، ثم اختبار هذه الطريقة لتحليل بعض العينات المسوقة للمادة الفعالة وعزل الشوائب التي يزيد تركيزها عن 0.1% وتحديد بنيتها باستخدام تقنيات استعراف البنية.

أهمية البحث وأهدافه

تكمن أهمية هذا البحث في كونه:

- 1- تطبيقي يمكن استخدامه في تعيين مرتسم الشوائب لمادة داباغليفلوزين بروبانديول مونوهيدرات (غير المدرجة على أحدث لوائح دساتير الأدوية) للحكم على نقاوة وجودة المادة الأولية المستخدمة.
- 2- يذكر طريقة جديدة لفصل المركبات شبيهة البنية بهذا المركب الدوائي عالي الأهمية العلاجية في تدبير الداء السكري النمط الثاني خاصة مع كثرة مصنعي المادة الأولية.
- 3- الطريقة المطورة هي طريقة مؤشر للثبات لتعيين تركيز المادة الفعالة مع وجود نواتج التخرب.
- 4- الطريقة المطورة أقل استهلاكاً للوقت وغير منشورة حتى هذه اللحظة.
- 5- نجح في التحديد الكيفي (تحديد بنية) والكمي للشائبة المعزولة والتي تجاوزت نسبتها عتبة التبليغ المذكورة في الدلائل الإرشادية العالمية وذلك ضمن أحد العينات المسوقة للمادة الفعالة.

طرائق البحث ومواده:

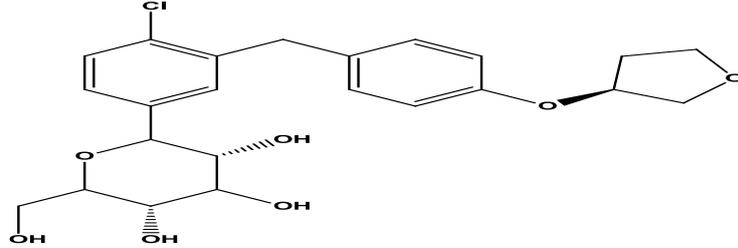
المواد والكواشف المستخدمة:

- عياري مرجعي Dapagliflozin Propandiol Monohydrate نقاوة 99.992% إنتاج شركة Huainan Shunlong Pharmaceutical Co. Ltd الصين.

- مادة مشوية Dapagliflozin Propandiol Monohydrate نقاوة % 82.55 إنتاج Hubei Derun Ltd, China, Pharmaceutical Co. الصين.

- مادة تجارية مسوقة Dapagliflozin Propandiol Monohydrate نقاوة % 98.52 إنتاج شركة Morebean الصين.

- عياري Empagliflozin نقاوة % 99.42 إنتاج شركة Hubei Derun Pharmaceutical Co., Ltd الهند الذي يمتلك البنية الكيميائية المبينة في الشكل رقم (2) القريبة جدا من بنية داباغليفلوزين.



Chemical Formula: $C_{23}H_{27}ClO_7$
Molecular Weight: 450.91

الشكل (2) الصيغة الكيميائية المنشورة لـ Empagliflozin

- محلات عضوية: أسيتونتريل نقاوة % 99.5 HPLC إنتاج Sigma Aldrich ألمانيا.
- فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين $K_2H_2PO_4$ وحمض Ortho Phosphoric و بروميد البوتاسيوم نوع تحليلي عالي النقاوة إنتاج شركة Merck ألمانيا.

- ماء ثنائي التقطير خاص بـ HPLC تم الحصول عليه باستخدام جهاز Simenens Water Technologies Labostar.
التجهيزات المستخدمة:

جرى تحضير العينات باستخدام عدد من التجهيزات والأدوات المتوفرة في مخابر كلية الصيدلة جامعة تشرين ومخابر زين فارما للصناعات الدوائية (صافيتا) ومخابر هيئة الطاقة الذرية (دمشق).

- ميزان Sartorius بدقة ± 0.0001 mg، وجهاز pH من شركة Sartorius نموذج PB11 مزود بمسرى زجاجي، وماصة آلية Micropipette ألمانية الصنع من نوع Eppendorf سعنتها العظمى $1000 \mu L$ ويمكن التحكم بحجمها عن طريق معدلة الحجم، وجهاز الأمواج فوق الصوتية Ultrasonic إنتاج شركة Jeken Digital، وجهاز التبخير بالآزوت.

- جهاز Analytical HPLC ماركة Shimadzu اليابان مزود بمكشاف PDA (زين فارما).
- جهاز التحليل العنصري Elemental Analyzer ماركة GmbH Elemntar Analyzensysteme VarioMICRO III

- جهاز triple quad LC-MS/MS ماركة Shimadzu اليابان موديل LCMS8060 (هيئة الطاقة الذرية) حجرة ثبات ضوئي لشركة Memert ألمانيا.

- جهاز HPLC-Semi-preparative موديل PU-2087 لشركة Jasco اليابان مزود بمكشاف PDA (هيئة الطاقة الذرية).

- جهاز مطيافية الأشعة تحت الحمراء FT-IR ماركة Shimadzu اليابان (زين فارما للصناعات الدوائية).

- جهاز الرنين النووي المغناطيسي Bruker 400 MHz Ultra shield TM Instrument (هيئة الطاقة الذرية).

طرائق البحث:

1- الشروط الاستشرابية الخاصة بـ HPLC التحليلية

جرى عزل الشوائب باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC. وذلك على عمود Hypersil C₁₈ بأبعاده (150 mm وقطره الداخلي 4.6 mm وأبعاد أجزاء الفيلم 5µm) بدرجة حرارة 30 °C. تألف الطور المتحرك المستعمل من الطور A وهو (وقاء ثنائي الفوسفات محضر بإضافة 1.36g في 1000 mL من الماء وضبطت حموضة المحلول باستعمال حمض Orthophosphoric Acid حتى القيمة pH = 3.2) والطور B (أسيتونتريل). رُشح الطور المتحرك باستعمال مرشح 0.45 µm ونزعت الغازات باستعمال جهاز Ultrasonic. حجم الحقنة المستعمل 20 µL تم تطبيق تدفق مقداره 1.0 mL/min وفق النمط المدروج Gradient [Time (min) / Pump B Value (%)] [0.01/20, 5.0/20, 15.0/80, 20.0/80, 25.0/20, 30.0/20]. وأجري الكشف باستخدام كاشف Photo Diode Array PDA عند طول موجة 240 nm.

2- الشروط الاستشرابية الخاصة بـ Liquid Chromatography – Mass Detector (LC-MS)

أجريت التحاليل بتطبيق الشروط ذاتها المستعملة في HPLC التحليلية مع استبدال الكاشف بـ مطيافية الكتلة MS حيث تم التأين بالردّ الإلكتروني في المجال الموجب ESI⁺، واستخدام المتناوبات المذكورة في الجدول رقم (1). تم تسجيل Total Ion Chromatogram TIC للعينات المدوسة لتحديد الوزن الجزيئي للمركبات المحتجزة عند كل زمن احتباس.

الجدول رقم (1) متناوبات التحليل باستخدام مكشاف مطيافية الكتلة

Fragmentor Voltage	170 v
Capillary voltage	3500 v
skimmer	60 v
Drying gas	10L.min-1 ; 350°C

3- الشروط الاستشرابية الخاصة بـ HPLC التحضيرية

عزلت الشوائب باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC التحضيرية حيث طبقت الشروط ذاتها المستعملة في طريقة HPLC التحليلية واستبدل العمود بعمود Water C₁₈ بأبعاده (طوله 250 mm وقطره الداخلي 20.1 mm وأبعاد أجزاء الفيلم 5µm). وكان حجم الحقنة المستعمل 500.0 µL وطبق تدفق مقداره 16 mL/min وفق النمط المدروج Gradient [Time (min) / Pump B Value (%)] [0.01/20, 5.0/20, 15.0/80, 20.0/80, 25.0/20, 30.0/20]. وأجري الكشف باستخدام كاشف PDA عند طول موجة 240 nm.

4- الشروط الخاصة بمطيافية الرنين النووي المغناطيسي Nuclear Magnetic Resonance NMR

تم تسجيل طيف C₁₃-NMR في المجال 100 MHz، بينما جرى تسجيل H₁-NMR باستخدام حقل مغناطيسي 400 MHz. أستخدم دي ميثيل سلفوكسيد المديتر DMSO-d₆ كمحل في تحضير العينات، وتم تسجيل الانزياحات الكيميائية للبروتونات والكربون Chemical shifts ورمزها δ بالنسبة لمعياري داخلي ثلاثي ميثيل سيلان Trimethyl Silan TMS الذي لا يبدي أي انزياح في الحقول المطبقة (δ=0.00 ppm). كما وتم تحديد النسبة المئوية لمكونات العينة من الكربون والهيدروجين والأزوت باستخدام جهاز التحليل العنصري.

5- الشروط الخاصة بمطيافية الأشعة تحت الحمراء

سجلت أطيف الأشعة تحت الحمراء لكل المواد المدروسة وشوائبها ومنتجات تخرابها المعزولة بالحالة الصلبة بعد مزجها مع بروميد البوتاسيوم KBr ثم ضغطها على شكل قرص شفاف بلوري، تم تسجيل الطيف ضمن المجال 400- 4000cm^{-1} حيث بلغ الـ resolution 4cm^{-1} وعدد مرات المسح الضوئي 32 scans.

6- تحضير المحاليل الخاصة بـ HPLC**1-7- محلول التمديد Diluent**

مزيج من الأسيتونتريل والماء بنسبة 50:50 ح/ح.

2-7- المحاليل المعيارية الأم ومحاليل العمل

وزن 50.0 mg من معياري Dapagliflozin في بالون معاير سعة 25 mL تم حلُّه بأقل كمية من محلول التمديد وتم التأكد من التجانس وتام الذوبان باستخدام حوض الأمواج فوق الصوتية، ثم يكمل الحجم حتى خط العيار ليكون تركيز المحلول المعيارية الأم 2 mg/mL. لتحضير محلول العمل (بتركيز 1mg/mL) نُقل بدقة حجم 5.0 mL من العياري الأم إلى بالون حجمي سعة 10.0 mL ثم أكمل الحجم حتى خط العيار باستخدام محلول التمديد. حضرت المحاليل المعيارية ومحاليل العمل للعيينة التجارية والعيينة المشوبة باتباع الخطوات ذاتها المستخدمة في تحضير المحلول المعيارية. كما تم تحضير محلول أم لـ Empagliflozin بتركيز (0.2 mg/mL) ومحلول عمل بتركيز (0.1 mg/mL).

7- دراسات التحقق من مصدوقية الطريقة Validation

تم التحقق من مصدوقية الطريقة التحليلية وفقاً لتوصيات المؤتمر الدولي للمواءمة ICH عبر دراسة المتأينات التالية:

1-8- الخطية Linearity

لدراسة الخطية جرى تحضير محاليل مشتركة من المحلول المعيارية الأم لـ Dapagliflozin مع Empagliflozin، حيث جرى التمديد بمحلول التمديد. وتمت دراسة الخطية ضمن المجال $300-3000\ \mu\text{g/mL}$ بالنسبة لـ Dapagliflozin و $30-100\ \mu\text{g/mL}$ بالنسبة لـ Empagliflozin.

2-8- المضبوطية Accuracy

حضرت 9 عينات تقسم إلى ثلاث مجموعات تحوي على التالي 50% و 100% و 150% من Dapagliflozin و حضرت Empagliflozin (أي $500/50, 1000/100, 1500/150$ ، Dapagliflozin/Empagliflozin، $\mu\text{g/mL}$) وحسبت النسبة المئوية الاستعادة Recovery.

3-8- الدقة Precision

جرى تحري تكرارية الطريقة Repeatability من خلال إجراء 6 مكررات لمحلول المعيارية المشترك الحاوي على Dapagliflozin بتركيز (1.0 mg/mL) و Empagliflozin بتركيز (0.1 mg/mL) ومن ثم حساب الانحراف المعياري النسبي Relative Standard Deviation RSD%. بينما جرى تقييم الدقة الوسطى للطريقة التحليلية Intermediate precision من خلال تطبيق الطريقة نفسها في المختبر نفسه على الجهاز نفسه ولكن في أيام مختلفة ومن قبل محللين مختلفين.

4-8- المتانة Robustness

جرى تحليل ثلاث عينات من المعياري المشترك حيث تحقق بعد تعديل معدل التدفق إلى 1.2 mL/min أو 1.5ml/min و 1.6ml/min مع بقاء جميع الشروط الأخرى ثابتة كما ذكر سابقاً في الشروط الاستثنائية.

5-8- حد الكشف (DL) وحد القياس الكمي (QL) Quantitation Limit

تم تحديدها بطريقة نسبة الإشارة إلى الضجيج Signal/Noise s/n 3:1 و 10:1 لكل منهما على الترتيب.

6-8- ملائمة النظام System Suitability

تم حقن 6 مكررات من المحلول العياري بتركيز 1 mg/mL وتم حساب RSD% ومعامل التذليل Tailing Factor لمساحات القمم المسجلة وحساب عدد الصفائح النظرية Theoretical Platelets Number.

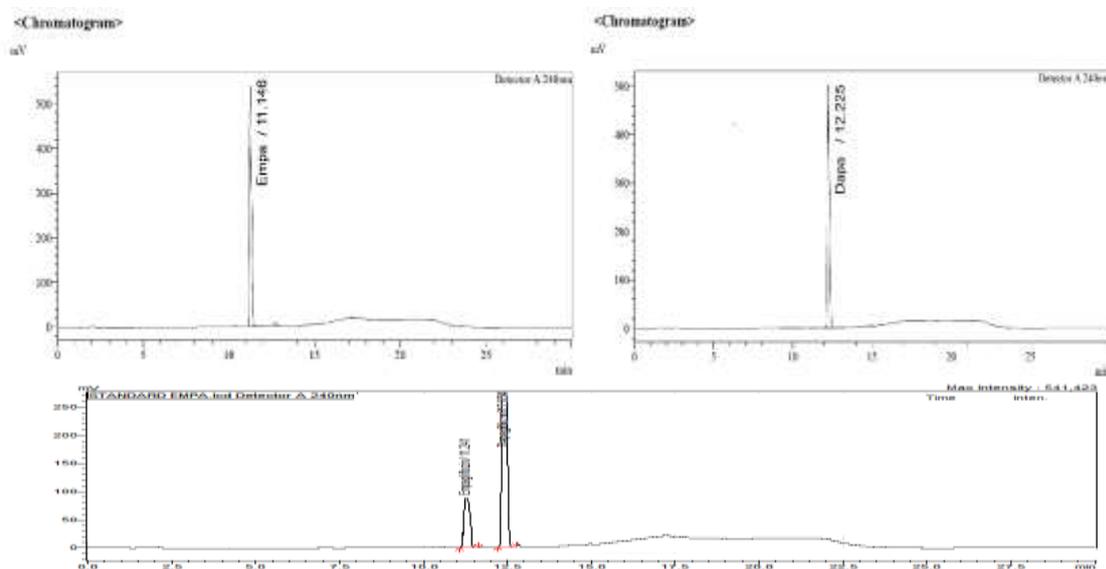
7-8- النوعية Specificity

تم قياس قدرة الطريقة على تحديد المادة المدروسة بوجود الشوائب والمركبات قريبة البنية (مثل Empagliflozin) وذلك عبر إجراء حقنة واحدة للمحلول المعياري لـ Dapagliflozin والمحلول العياري لـ Empagliflozin ومحلول العياري المشترك. كما أجريت دراسات الاجهاد (التخرب القسري) Stress Study عبر تعريض المادة لشروط مشددة وذلك لقياس قدرة الطريقة التحليلية المطورة على فصل داباغليفلوزين عن شوائبه ونواتج تخزبه. تم تسجيل أزمدة الاحتباس للمركبات المذكورة وحساب معامل الفصل (الميز Resolution) بين القمم المسجلة على المخطط الاستثنائي. أجريت الحلمهة الحامضية والقلوية باستعمال حمض كلور الماء 1N بدرجة حرارة 60°C تحت التقطير المرند مدة 8 ساعات، الحلمهة بوساطة هيدروكسيد الصوديوم 1N بدرجة حرارة 60°C تحت التقطير المرند مدة 8 ساعات، كما أجريت الأكدسة باستعمال حمض ماء أكسجيني 10% بدرجة حرارة 60°C تحت التقطير المرند مدة 8 ساعات. أجري التحلل الحراري بوضع توضع في فرن بحرارة 80°C مدة 72 ساعة أما التخرب الضوئي تم تحريضه بوضع محلول العياري في حجرة ثبات ضوئي تحت 200 Watt Hours/m² من ضوء الأشعة فوق البنفسجية لمدة 60 ساعة و10 أيام في ضوء الشمس.

النتائج والمناقشة:**A. تطوير الطريقة التحليلية:**

إن الهدف الرئيسي للطريقة التحليلية هو الوصول إلى فصل للشوائب عن المادة الفعالة في عينات المواد الأولية التي تم الحصول عليها وذلك تبعاً لطبيعة Dapagliflozin واختبارات الانحلالية اعتمد استعمال مزيج مدرج من الماء والأسيتونتريل المحمضين بـ OPA كطور متحرك وذلك لفصل كل من Dapagliflozin والشوائب المرافقة حيث استخدم Empagliflozin كبديل عن الشوائب نظراً للتشابه الكبير في البنية ولتشابه طريقة اصطناع المركبين ، وذلك لأن الفصل وشكل القمم باستعمال هذا الطور كان الأفضل منه عند ماء وميثانول. أما الطور الثابت فقد تم اختيار عمود Hypersil C₁₈ (150 mm وقطره الداخلي 4.6 mm وأبعاد أجزاء الفيلم 5µm) حيث تم باستعماله الوصول لفصل سريع وجيد Dapagliflozin عن Empagliflozin. لقد طبق أكثر من ثلاثين طريقة تحليلية باستخدام مدرج ومتساير Isocratic وأفضل فصل تم الحصول عليه باستعمال الأطوار السابقة وباستعمال حرارة 30 °C. كما أبدى المحلول أعلى امتصاص عند طول موجة 240 nm عند مسح المجال بين 200-400 nm باستعمال HPLC-

PDA. يمثل الشكل (3) المخطط الاستشرابي الذي تم الحصول عليه للمحلول العياري لـ Empagliflozin و Dapagliflozin.



الشكل (3) المخطط الاستشرابي للمحلول المعيارى لـ Dapagliflozin و Empagliflozin والمعيارى المشترك

B. نتائج التحقق من ملائمة النظام

وجد أن عامل التذليل Empagliflozin و Dapagliflozin كانا أقل من 1.2، وكان الميز أكبر من 2.0، كما وجد أن عدد الصفائح النظرية لكلا المادتين كان أكثر من 10000. يبين الجدول رقم (3) نتائج التحقق من ملائمة النظام

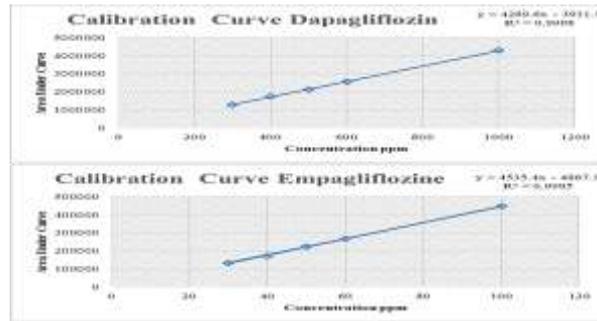
الجدول رقم (2) نتائج التحقق من ملائمة النظام لكل من Dapagliflozin و Empagliflozin

اسم المركب	زمن الاحتباس RT(min)	الميز Resolution	عامل التذليل Tailing factor	عدد الصفائح النظرية Theoretical plates (N)
Empagliflozin	11.15	-	0.989	32189
Dapagliflozin	12.225	4.251	1.103	268218

C. نتائج دراسة التحقق من مصدوقية الطريقة التحليلية

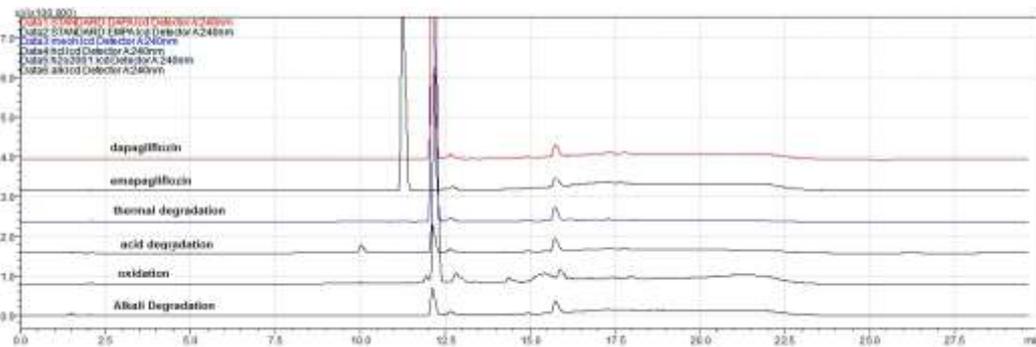
نتائج دراسات الخطية

جرى اختبار خطية منحنى المقايسة من خلال دراسة معامل الارتباط R^2 Correlation Factor بين التراكيز والاستجابة لكل تركيز (مساحة القمة AUC) ضمن المجال المدروس، فكان معامل الارتباط أكبر من 0.999 لكل من Empagliflozin و Dapagliflozin، وتم حساب معادلة الارتداد الخطي كما يوضح الشكل رقم (4).



الشكل (4) منحنى الاستجابة الخطية لـ Dapagliflozin و Empagliflozin مع قيم معامل الارتباط الخطي R2 ومعادلة الارتداد الخطي نتائج دراسة النوعية

بعد إخضاع Dapagliflozin لاختبارات التخرب القسري بحسب توصيات ICH جرى تحليل العينات المخربة باستعمال الطريقة التحليلية المطورة والتي مكنت من فصل Dapagliflozin عن الشوائب المرافقة له في API بشكل جيد، كما سمحت أيضاً بفصل جيد لـ Dapagliflozin عن منتجات التخرب (Degradation Products) الناتجة عن كل من الحملة الحمضية، والحملة القلوية، والأكسدة. ولم يلاحظ أي تداخل بين قمم المادة الفعالة (زمن احتباس 12.13 دقيقة) و Empagliflozin (زمن احتباس 11.15 دقيقة) وقم نواتج التخرب وقم المذيب حيث كانت قيم الميز R بين قمة Dapagliflozin وقم بقية الشوائب ونواتج التخرب أكبر من 1.5 كما لم يبد المذيب تداخل مع القمم المفصولة. تم حساب توازن الكتلة (توازن الكتلة = مفايسة المادة % + التخرب الكلي %) حيث لحظ التخرب في حالة الأكسدة حيث ظهرت 4 قمم لمنتجات تخرب عن الأزمنة (2.05، 10.02، 11.62، 14.31) دقيقة، وبلغت نسبة المادة المتخرية 11% وكان توازن الكتلة 103.8%، كما لحظ في حالة الحملة الحمضية ظهور ناتج تخرب عند 10.03 دقيقة بنسبة بلغت 4.2% وبلغ توازن الكتلة 99.28%. لم تُلاحظ منتجات تخرب ذات تركيز عالية في حالة الحملة القلوية والحرارة والتعرض للضوء. يظهر الشكل رقم (5) المخططات الاستشرابية التي تم الحصول عليها.



الشكل (5) المخطط الاستشرابية في دراسة النوعية توضح الفصل الجيد بين قمة Dapagliflozin و Empagliflozin ونواتج التخرب (التحلل الحراري، الحملة الحمضية، الأكسدة، الحملة القلوية) عند طول موجة 240 nm.

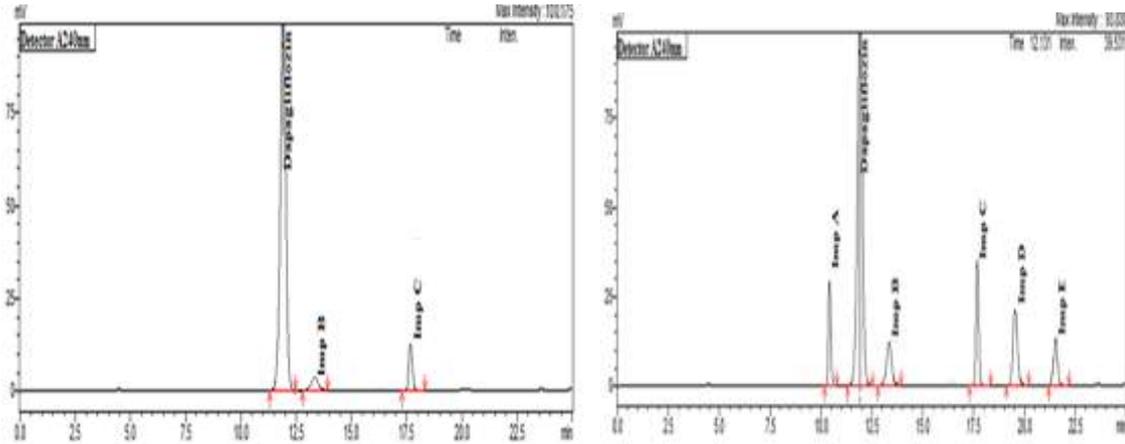
نتائج دراسة المضبوطية والدقة

جرى تقييم المضبوطية من خلال النسبة المئوية للاستعادة حيث كانت القيم عند كل المستويات المدروسة بين (85%-115%)، كما أن الانحراف المعياري النسبي %RSD لكل من الانتقائية والتكرارية والدقة الوسطى والمتانة كان أقل من 2%. ويلخص الجدول رقم (3) النتائج التي حُصل عليها.

الجدول رقم (3) نتائج دراسات المضبوطية والدقة والامتانة وحد الكشف وحد الكم

Dapagliflozin		Empagliflozin		المنتابث	
50%	التركيز 500 µg/ml Recovery: 100.14%	50%	التركيز 50 µg/ml Recovery: 103.08%	المضبوطية	
100%	التركيز 1000 µg/ml Recovery: 99.98%	100%	التركيز 100 µg/ml Recovery: 98.95%		
150%	التركيز 1500 µg/ml Recovery: 99.79%	150%	التركيز 150 µg/ml Recovery: 99.02%		
Recovery: 100.09% *RSD: 0.71		Recovery: 99.88% *RSD: 0.92		التكرارية	الدقة
Recovery: 100.13% *RSD: 0.65		Recovery: 98.74% *RSD: 1.2		الدقة الوسطى	
Recovery: 99.78% Retention time : 13.701		Recovery: 99.78% Retention time : 13.05		0.8 mL/min	الامتانة
Recovery: 100.12% Retention time : 12.21		Recovery: 99.78% Retention time : 11.15		1.0 mL/min	
Recovery: 100.48% Retention time : 11.678		Recovery: 99.78% Retention time : 10.75		1.2 mL/min	
0.204 (µg/ml)		0.673(µg/ml)		حد الكشف (LOD)	
0.676 (µg/ml)		2.230(µg/ml)		حد القياس الكمي (LOQ)	

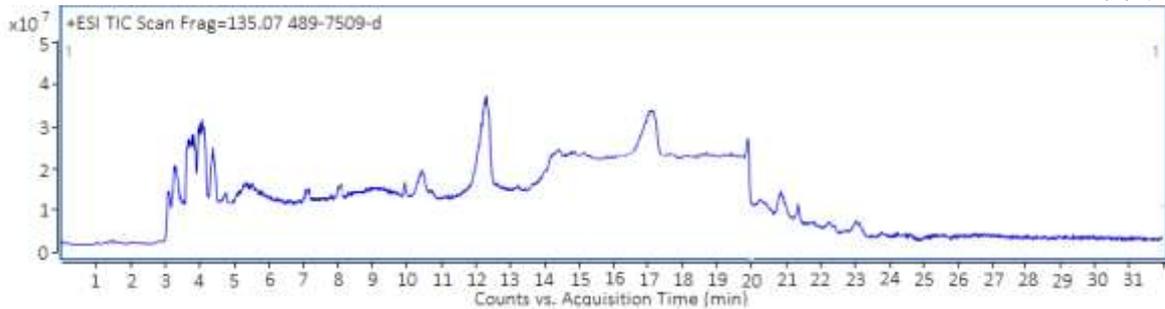
توافقت الطريقة المطورة مع متطلبات ICH لتعيين وفصل Dapagliflozin عن المركبات المشابهة بالبنية. وأبدت الطريقة قدرة جيدة على فصل المادة الفعالة عن منتجات تخريبها مما يجعلها طريقة مؤشرة للثبات Stability indicating ثم تم اختبار الطريقة على عينة مشوبة Crude وعينتين تجاريتين للمادة الفعالة حيث ظهرت (في احدى العينات التجارية) قمم لمجموعة من الشوائب تم عزل الشائبة التي ظهرت قممها عند زمن احتباس 17.53 دقيقة وبلغت نسبتها 0.9% من مساحة قمة العياري وبلغت نسبتها (في العينة المشوبة) 6.9% من مساحة قمة العياري عند زمن الاحتباس ذاته مما استوجب عزلها وتحديد بنيتها وفقاً لمتطلبات ICH. يوضح الشكل رقم (6) المخطط الاستشرابي لعينة المادة المشوبة.



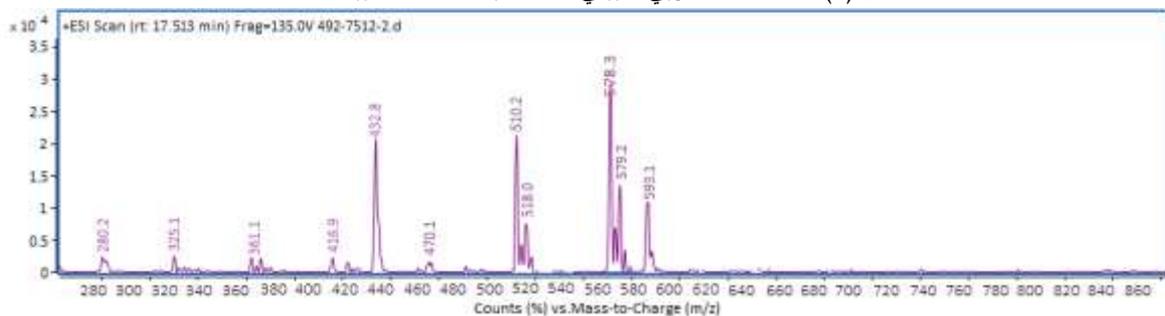
الشكل (6) المخطط الاستشرابي للمحلول المادة المشوبة Crude والعينة التجارية

تحديد الوزن الجزيئي للشائبة المرافقة

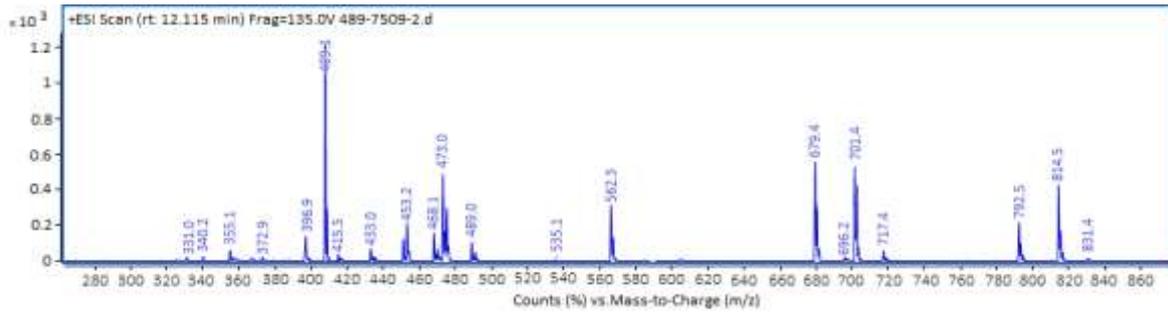
استخدمت طريقة LC-MS في تعيين وتحديد الأوزان الجزيئية لكل من Dapagliflozin وشوائبه عن طريق تحديد نسبة الكتلة/ الشحنة وتم تسجيل المخطط الأيوني الاستشرابي الشكل رقم (7)، حيث أظهرت دراسة الخصائص الأيونية لقمة المركب الشائبة C الشكل رقم (8) التي ظهرت عند زمن احتباس 17.51 دقيقة أن $M+1 = 578.3$ m/z، بينما عند زمن احتباس 12.13 دقيقة كانت $M+1 = 409.1$ m/z وهو يتوافق مع Dapagliflozin كما يظهر في الشكل رقم (9).



الشكل (7) المخطط الاستشرابي الأيوني TIC لعينة المادة المشوبة Crude



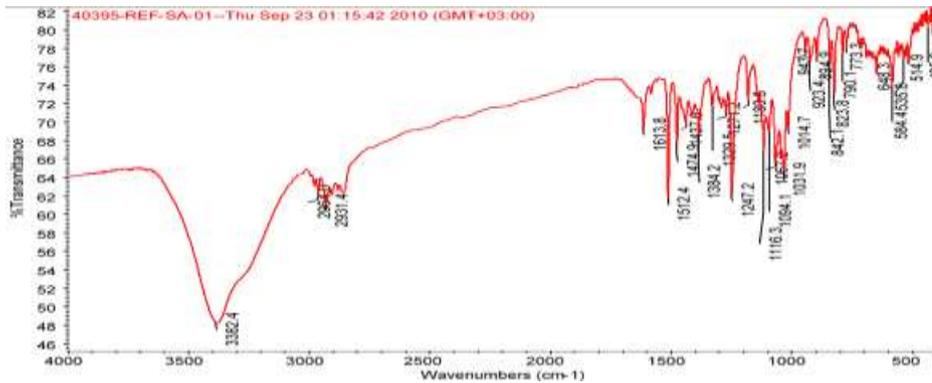
الشكل (8) الخصائص الأيونية للشائبة (Impurity C) عند زمن احتباس 17.513 دقيقة



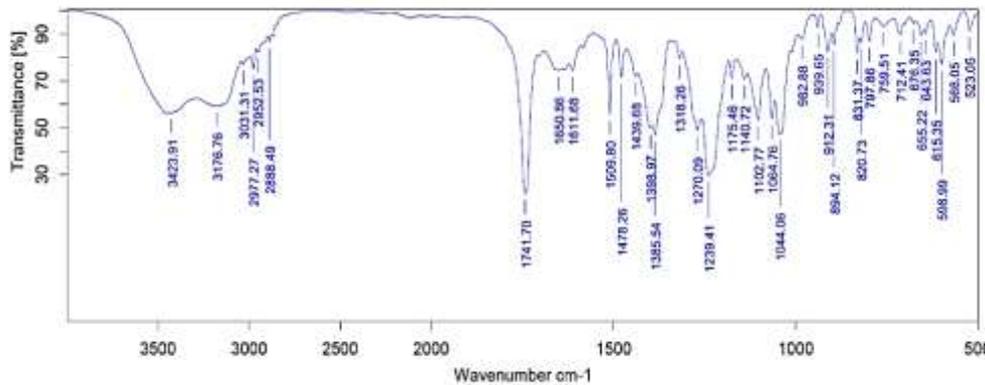
الشكل (9) الخصائص الأيونية لـ Dapagliflozin عند زمن احتباس 12.112 دقيقة

التحديد الكيفي للشائبة

استخدمت تقنية Preparative في عزل الشائبة (Impurity C) عند زمن احتباس 17.51 min وتم تبخير المحل بواسطة جهاز التبخير بالآزوت والحصول عليها بشكل صلب وسجل طيف FT-IR لـ Dapagliflozin الشكل رقم (10) وللشائبة (Impurity C) الشكل رقم (11). يوضح الجدول رقم (4) أهم العصابات المسجلة على طيفي FT-IR المسجلين ودلالاتها ولحظ من طيف Impurity C تناقص كبير في شدة العصابة الدالة على مجموعة O-H والتي توجد ضمن طيف Dapagliflozin كما ظهرت عصابة عند 1741 cm⁻¹ تدل على وجود مجموعة استر أليفاتية. وأظهرت المقارنة مع المكتبة المتوفرة وجود تطابق مع بنية مركبات حاوية على خلات الايثيل Ethyl Acetate ضمن الشائبة المعزولة.



الشكل (10) طيف الأشعة تحت الحمراء المسجل للمعاري Dapagliflozin

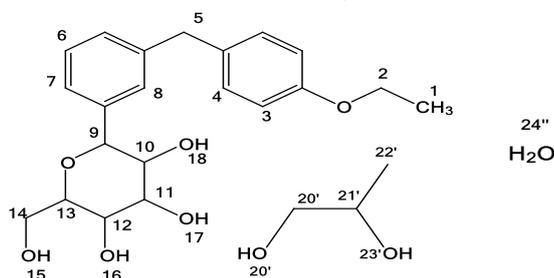


الشكل (11) طيف الأشعة تحت الحمراء المسجل للشائبة Impurity C

الجدول رقم (4) العصابات المسجلة على طيف FT-IR للمعياري Dapagliflozin والشائبة Impurity C

العدد الموجي cm^{-1}		الدلالة
Impurity C	Dapagliflozin	
3423	3371, 3266	Stretching O-H (امتطاطية)
3176, 3035	-	Stretching = C - H
2977-2888	2932, 2861	CH ₃ /CH ₂ Stretching C-H
2000-1700	2000-1700	Overtone
1741	-	Aliphatic ester (أستر أليفاتي)
1651,1614	1613	Stretching C=C
1245	1247	bending C=C-H (انحنائية)
1055, 1036	1067, 1032	Bending C=C-H or Stretching C-O-C
895, 824	895, 824	Substituted Benzene Ring Bending C-H

جرى تحليل مكونات المادة الفعالة باستخدام التحليل العنصري حيث بينت النتائج احتواءها على كربون بنسبة 60.51% ما يعادل 29 ذرة كربون وهيدروجين بنسبة 5.588% والذي يعادل بدوره 33 ذرة هيدروجين. كما تم تسجيل طيف الرنين النووي المغناطيسي لمركب Dapagliflozin والشائبة (Impurity C). يوضح الشكل رقم (12) ترقيم ذرات الهيدروجين في المركب المعياري Dapagliflozin وبين الجدول رقم (5) تفسير الإشارات المسجلة على طيف H¹-NMR أحادي البعد 1D كما يوضح اقتران البروتونات المتجاورة باستخدام H-H Cosy NMR. بينما يوضح الشكل رقم (13) ترقيم ذرات الكربون في المركب المعياري Dapagliflozin وبين الجدول رقم (6) انزياح ذرات الكربون لمركب Dapagliflozin والمسجلة باستخدام C¹³-NMR و DEPT 90 و DEPT 135.

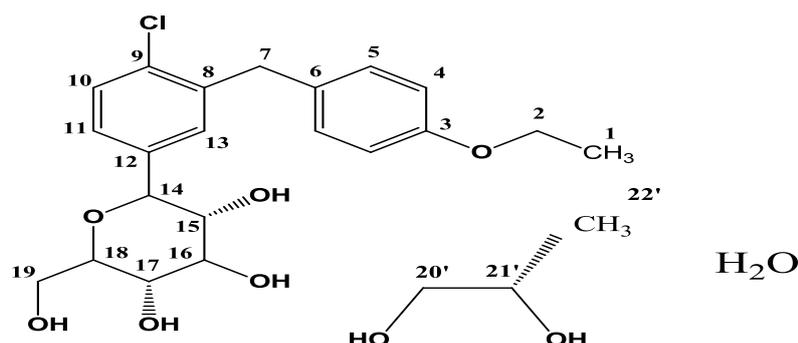


الشكل (12) ترقيم ذرات الهيدروجين لمركب Dapagliflozin Propandiol monohydrate

الجدول رقم (5) معلومات طيف H¹-NMR لمعياري Dapagliflozin

Dapagliflozin Propandiol Monohydrate			
رقم الهيدروجين	الانزياح ppm	عدد الهيدروجين، انقسام القمة، ثابت التزاوج J	H-H Cosy
H-22'	1.00	3H,d, J=6.25Hz	H-21
H-1	1.27	3H,t, J=7.0Hz	H-2
H-20', 10-13	3.10-3.30	6H, m	H-21
H-24''	3.36	2H, s	
H-14	3.44-3.48	1H,m	
H-21'	3.55-3.60	1H,m	
H-14	3.69-3.72	1H,m	
H-2,5,9	3.94-4.02	5H,m	H-1, H-10
H-23'	4.38	1H,d, J=4.5Hz	

H-17,19	4.42	2H,dd, J=5.5, 3.4Hz	
H-16	4.80	1H,d, j=5.8Hz	
H-15,18	4.93	2H,dd, J=2.9, 3.4Hz	
H-3	6.81-6.83	2H,d, J=8.4Hz	H-4
H-4	7.08-7.10	2H,d, J=8.3Hz	H-3
H-7	7.22-7.24	1H,d, J=8.2Hz	H-6
H-8	7.32	1H,s	
H-6	7.35-7.37	1H,d, J=8.2Hz	H-7



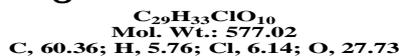
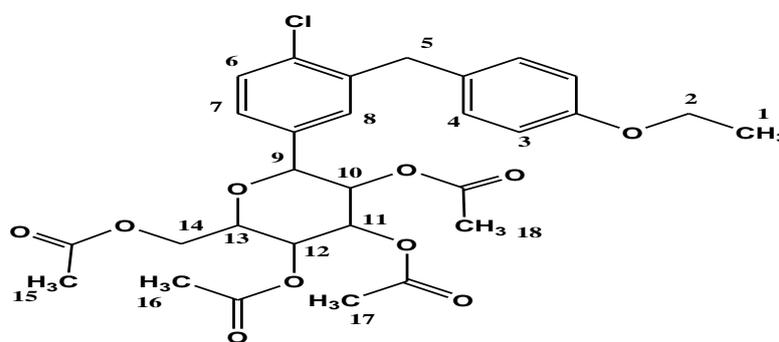
الشكل (13) ترقيم ذرات الكربون لمركب Dapagliflozin Propandiol monohydrate

الجدول رقم (6) انزياح ذرات الكربون لمركب Dapagliflozin المسجلة باستخدام C13-NMR و DEPT 90 و DEPT 135

Dapagliflozin Propandiol Monohydrate					
رقم الكربون	الانزياح ppm	C-H Cosy	DEPT135	DEPT 90	نوع الكربون
C-1	14.64	1.27	+	None	أولي
C-22	19.92	1.00	+	None	أولي
C-7	37.64	3.94 -4.02	-	None	ثانوي
C-19	61.36	3.44 -3.48, 3.69 - 3.72	-	None	ثانوي
C-2	62.88	3.94 -4.02	-	None	ثانوي
C-21	67.19	3.55 -3.60	+	+	ثالثي
C-20	67.25	3.10 -3.30	-	None	ثانوي
C-15	70.31	3.15 -3.20	+	+	ثالثي
C-17	74.69	3.10 - 3.15	+	+	ثالثي
C-16	78.30	3.25 - 3.30	+	+	ثالثي
C-14	80.67	3.94 -4.2	+	+	ثالثي
C-18	81.15	3.20 - 3.25	+	+	ثالثي
C-4	114.29	6.81 - 6.83	+	+	ثالثي
C-11	127.30	7.22 -724	+	+	ثالثي
C-10	128.63	7.35 -7.37	+	+	ثالثي
C-5	129.53	7.08 -7.10	+	+	ثالثي
C-13	130.76	7.32	+	+	ثالثي

C-9	131.20		None	None	رابعي
C-6	131.91		None	None	رابعي
C-12	137.78		None	None	رابعي
C-8	139.63		None	None	رابعي
C-3	156.88		None	None	رابعي

بدراسة طيف H1-NMR والشائبة (Impurity C) ومقارنته مع طيف Dapagliflozin العياري تبين غياب الإشارات الدالة على وجود البروتون العائد لمجموعات الهيدروكسيل على جزيئة الغلوكوز، وظهور إشارات جديدة تدل على الايثيل أسينات كما يوضح الجدول رقم (7)، كما بينت دراسة طيف C13-NMR للشائبة ظهور 27 إشارة من بينها 4 إشارات في مجال (ppm 170-185) دالة على كربون مرتبط بأوكسجين C=O في الحموض الكربوكسيلية والاسترات مما يدل على وجود أربع ذرات C=O ذات بيئات الكترونية مختلفة، كما اختفت الإشارات الدالة على وجود كربون مرتبط بمجموعة هيدروكسيل. تم تحليل البيانات التي تم جمعها تم التأكد من ان الشائبة Impurity C هي مركب Dapagliflozin Tetraacetate ذات الوزن الجزيئي 577 g/mol وهو أحد الشوائب المعروفة لداباغليفلوزين ويعتبر مركب وسطي Intermediate في سبيل اصطناع داباغليفلوزين. كما يوضح الجدول رقم (8) إشارات ذرات الكربون في الشائبة المعزولة والمرقمة في الشكل رقم (15) على طيف C13-NMR



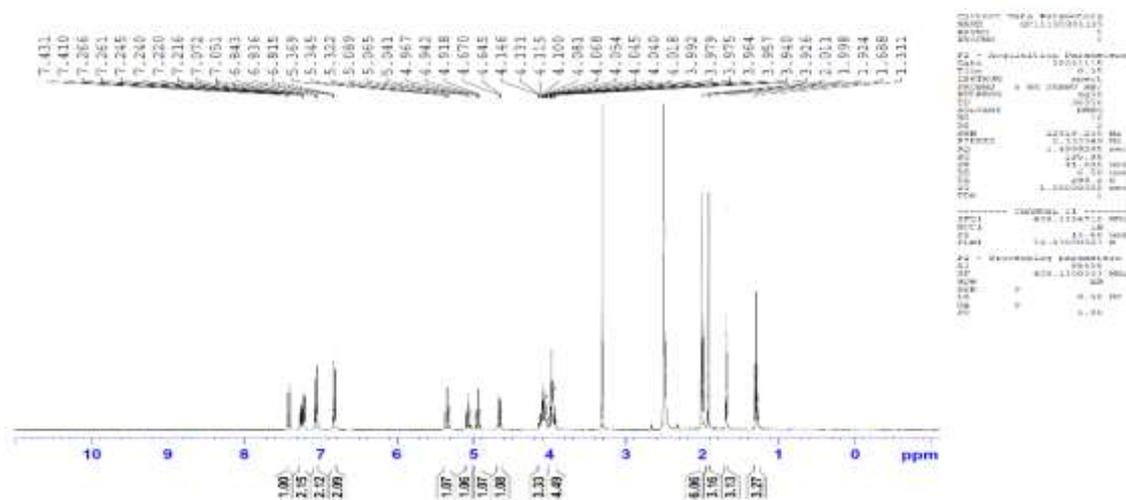
الشكل (14) ترقيم ذرات الهيدروجين للشائبة Impurity C

الجدول رقم (7) انزياح البروتونات في الشائبة Impurity C على طيف H1-NMR

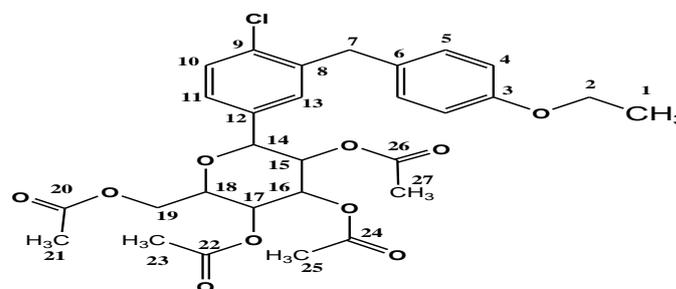
رقم ذرة الهيدروجين	ppm الانزياح	عدد البروتونات	الانقسام	ثابت التزاوج
H-1	1.31-1.27	3H,d, J=7.2Hz	d	7.2Hz
H-2,5	4.01-3.94	4H,m	m	
H-3	6.84-6.81	2H,d, J=	d	
H-4	7.07-7.05	2H,d, J=	d	8.4Hz
H-6	7.43-7.41	1H,d,J=	d	8.4Hz
H-7,8	7.26-7.21	2H,m	m	
H-9,14	4.14-4.04	3H,m	m	

H-10	4.67-4.64	1H,d, J=9.7Hz	d	9.7Hz
H-11	5.08-5.04	1H,t, J=9.6Hz	t	9.6Hz
H-12	4.96-4.91	1H,t, J=9.6Hz	t	9.6Hz
H-13	5.36-5.32	1H,t, J=9.6Hz	t	9.6Hz
H-15,18	1.92	3H,s	s	
H-16,17	1.68	3H,s	s	
H15,16,17,18	2.01-1.92	6H,d, J=5.2Hz	d	5.2 Hz

SP-016-020
1H-NMR\DMSO



الشكل (15) طيف H1-NMR باستخدام محل DMSO-d6

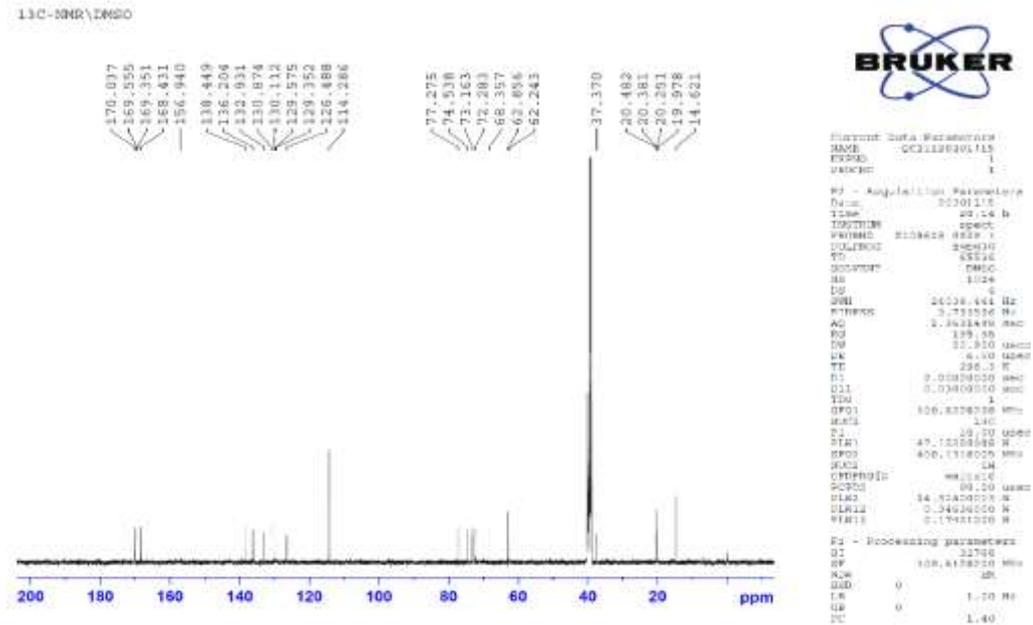


الشكل (16) ترقيم ذرات الكربون للشائبة المعزولة Impurity C

الجدول رقم (8) انزياح ذرات الكربون في الشائبة المعزولة Impurity C

رقم ذرة الكربون	الانزياح ppm	رقم ذرة الكربون	الانزياح ppm	رقم ذرة الكربون	الانزياح ppm
C-1	14.62	C-16	73.16	C-12	136.20
C-21	19.97	C-14	74.53	C-8	138.44
C-23	20.25	C-18	77.27	C-3	156.93
C-25	20.38	C-4	114.28	C-20	168.43
C-27	20.48	C-11	126.48	C-22	169.35

C-7	37.36	C-10	129.35	C-24	169.55
C-19	62.24	C-5	129.57	C-26	170.03
C-2	62.85	C-13	130.11		
C-15	68.35	C-9	130.87		
C-17	72.28	C-6	132.93		



الشكل (17) طيف C13-NMR باستخدام محل DMSO-d6 Impurity C

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات

- ❖ تشير النتائج إلى أن الطريقة المطورة دقيقة ونوعية وحساسة (بلغ حد الكشف لـ Dapagliflozin 0.204 µg/mL) في تعيين مرتسم شوائب.
- ❖ استخدام طريقة الكروماتوغرافيا السائلة التحضيرية لعزل أحد الشوائب التي تجاوزت نسبتها عتبة التبليغ في إحدى المواد التجارية المسوقة لهذا المركب الدوائي.
- ❖ اقترحت الدراسة طريقة جديدة من نمط الكروماتوغرافيا السائلة المقترنة بمكشاف مطيافية الكتلة LC-MS لتحري وجود الشوائب ونواتج التخراب ضمن هذا المركب الدوائي الهام جداً.
- ❖ تمكنت الدراسة بنجاح من تحديد هوية الشائبة المعزول باستخدام التحليل العنصري ومطيافية الأشعة تحت الحمراء ومطيافية الكتلة ومطيافية الرنين النووي المغناطيسي.
- ❖ الشائبة التي تم عزلها هي Dapagliflozin Tetraacetate وهي شائبة معروفة (منتج وسيط) لكنها غير مدروسة في الدراسة المنشورة.

التوصيات

- 1- اعتماد الطريقة المطورة في تعيين مرتسم الشوائب لعدد أكبر من العينات التجارية المسوقة لداباغليفلوزين.
- 2- استخدام الطريقة نفسها في تعيين مرتسم شوائب Empagliflozin ضمن المادة الفعالة.
- 3- اختبار الطريقة على تعيين الشوائب ضمن الأشكال الصيدلانية للمادتين المذكورتين.
- 4- زيادة الاهتمام بإجراء أبحاث متعلقة بمرتسمات الشوائب ومرتسمات نواتج التخراب للمواد الفعالة.

Reference

- [1] International Conference on Harmonization ICH of Technical Requirement for Registration of Pharmaceutical for Human Use, Impurities in New Drug Substances Q3A, 2006.
- [2] United States Pharmacopeial Council of experts. The United States pharmacopeia. The national formulary. Vol. 1, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, 2013, 5931.
- [3] GOROG, S. *Critical review of reports on impurity and degradation product profiling in the last decade*, Trends in Analytical Chemistry. 2017, Vol.(101). 2018. 2-16.
- [4] <https://www.medicines.org.uk/emc/product/2865/smpc>. emc- Forxiga 5 mg film coated tablets. 2019; Accessed on 27.2.
- [5] DANDONA, P. et al. *Efficacy and Safety of Dapagliflozin in Patients With Inadequately Controlled Type 1 Diabetes: The DEPICT-1 52-Week Study*. Diabetes Care, Vol.(41) No.(12). 2018. 2552–2559.
- [6] DANDONA, P. et al. *Efficacy and safety of dapagliflozin in patients with inadequately controlled type 1 diabetes (DEPICT-1): 24 week results from a multicentre, double-blind, phase 3, randomised controlled trial*, Lancet Diabetes Endocrinol. U.S.A, Vol.(5) No.(11). 2017. 864-876.
- [7] NICHOLSON M. K, ASSWAD R. G, WILDING J. P. *Dapagliflozin for the treatment of type 2 diabetes mellitus - an update*, Expert Opin Pharmacother, Vol. (22) No. (17). 2021. 2303-2310.
- [8] ZAZA, S. et. al. *Recent advances in the separation and determination of impurities in pharmaceutical products*, Instrumentation Science and Technology, Italy, 2014.
- [9] AROUS, B. A comparative analytical study of the chemical structural relationship between impurity profiles and the possible degradation products of anticoagulants (direct factor Xa inhibitors and direct thrombin inhibitors) and its impact in evaluation the quality of their pharmaceutical products, Ph.D thesis. Damascus University, Syria, 2018.
- [10] MAGGIO, R.M., CALVO, N.L., VIGNADUZZO, S.E., KAUFMAN, T.S., *Pharmaceutical impurities and degradation products: Uses and applications of NMR techniques*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Vol (101) No. (22), 2014.
- [11] AHUJA, S, ALSANTE, K. M, Handbook of isolation and characterization of impurities in pharmaceuticals, Vol. (5), Academic Press, U.S.A, 2013.
- [12] GANORKAR, S. B., et. al. *Pharmaceutical Analytical Profile for Novel SGL-2 Inhibitor: Dapagliflozin*, Critical Reviews in Analytical Chemistry, U.S.A, 2020.
- [13] GRACE, C. A, PRABHA, T, SIVAKUMAR, T. *Development and validation of high-performance liquid chromatographic method for determination of dapagliflozin and its impurities in tablet dosage form*, Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, India, Vol. (12) No. (3), 2019, 447-453.
- [14] International Conference on Harmonization. ICH. ICH Q2 (R1): Guideline on validation of analytical procedure: Text and methodology, 2005.