

VREDNOTENJE PEPTIDA TETRAKOZAKTIDA V GALENSKIH IZDELKIH ZA IZVEDBO HITREGA TESTA ACTH

EVALUATION OF TETRACOSACTIDE PEPTIDE IN GALENIC FORMULATIONS FOR RAPID ACTH TEST

AVTORJA / AUTHORS:

Aleksandra Bračko, mag. farm., spec.¹
prof. dr. Janez Ilaš, mag. farm.²

¹ Univerzitetni klinični center Maribor,
Centralna lekarna,
Ljubljanska ulica 5, 2000 Maribor

² Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za farmacevtsko kemijo,
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: aleksandra.bracko@ukc-mb.si

POVZETEK

Tetrakozaktid je sintezni analog človeku lastnega adrenokortikotropnega hormona (ACTH), ki spodbuja sproščanje kortizola iz skorje nadledvične žleze. Na voljo imamo več funkcijskih testov za oceno delovanja skorje nadledvične žleze: hitri in večdnevni test ACTH, inzulinski tolerančni test, metiraponski test in deksametazonske teste. Pri hitrem testu ACTH z injiciranjem tetrakozaktida sprožimo izločanje kortizola iz nadledvičnih žlez. Tako pridobljeno raven kortizola primerjamo s tisto pred testom – bazalni ACTH. Če koncentracija kortizola 30 do 60 minut po aplikaciji ne naraste, je skorja nadledvičnih žlez atrofična. V slovenskih bolnišnicah in ambulantah največkrat pripravljamo raztopino tetrakozaktida s koncentracijo 5 µg/mL v steklenih vialah. V Centralni lekarni Univerzitetnega kliničnega centra Maribor (UKC Maribor) že od leta 2016 za potrebe oddelkov polnimo raztopino tetrakozaktida v brizge. Redčenje industrijskega zdravila s fiziološko raztopino opravimo po aseptičnem postopku. Za izvedbo hitrega testa ACTH zadostuje obremenitev preiskovanca z 1 µg tetrakozaktida. V članku opisujemo farmakopejsko metodo za vrednotenje tetrakozaktida ter uporabo najsodobnejših analiznih metod, ki bi jih lahko uporabili za vrednotenje končnih pripravkov tetrakozaktida.

KLJUČNE BESEDE:

identifikacija nečistot, kortizol, test ACTH, tetrakozaktid, vsebnik

ABSTRACT

Tetracosactide is a synthetic analog of the human adrenocorticotrophic hormone (ACTH) that stimulates the release of cortisol from the adrenal cortex. There are several functional tests available to assess the adrenal cortex function: rapid and multi-day ACTH tests, insulin tolerance test, metyrapone test and dexamethasone tests. In the rapid ACTH test, cortisol secretion from the adrenal glands is stimulated by injecting tetracosactide. The resulting cortisol level is compared to the baseline ACTH level before the test. If the cortisol level does not increase 30–60 minutes after the application, it indicates adrenal cortical atrophy. In Slovenian hospitals and outpatient clinics, tetracosactide solution with a concentration of 5 µg/mL is most often prepared in a glass vial. In

2016, the Central Pharmacy of the University Medical Centre Maribor started with the aseptic preparation of tetracosactide solution filled in syringes at the request of hospital departments. The industrial drug was diluted in sodium chloride solution under aseptic conditions. To perform a rapid ACTH test, it is sufficient to load the patient with 1 µg of tetracosactide. The article describes a pharmacopoeial method for the evaluation of tetracosactide and the use of state-of-the-art analytical methods that could be used to evaluate tetracosactide final preparations.

KEY WORDS:

ACTH test, container, cortisol, impurity identification, tetracosactide

1 UVOD

1.1 ENDOKRINI SISTEM

Človeški organizem je sestavljen iz številnih celic, za katere je pomembno, da imajo vzpostavljen dober mehanizem medceličnega komuniciranja. Za usklajeno delovanje medceličnih interakcij sta se razvila dva sistema. Prvi je živčni sistem, pri katerem se signali prenašajo po živcih, drugi pa je endokrini sistem, pri katerem so prenašalci signalov hormoni. Hipotalamus in hipofiza tvorita funkcionalno enoto, ki povezuje živčni in endokrini sistem (1).

Endokrini sistem sestavljajo endokrine žleze (žleze z notranjim izločanjem) in endokrine celice, ki so razpršene po različnih tkivih. Z izločanjem hormonov sistem poskrbi za normalno rast, razvoj, razmnoževanje, prilagajanje na stres in presnovno aktivnost organizma (2). Glavni organi endokrinega sistema so hipotalamus, hipofiza, češerika, ščitnica in obščitnice, nadledvični žlezi, Langerhansovi otočki trebušne slinavke, jajčnika in moda. Hipofizo imenujemo tudi nadrejena žleza, saj je odgovorna za pravilno delovanje mnogih drugih endokrinih žlez (1).

1.2 ADRENOKORTIKOTROPNI HORMON IN KORTIZOL

Kortizol je kortikosteroidni hormon, ki spada med t. i. stresne hormone. Izločanje kortizola iz skorje nadledvične žleze sproži adrenokortikotropni hormon (ACTH), ki ga v stresnih

situacijah sprošča hipotalamus. Izhodna spojina za sintezo kortizola je holesterol, ki se v več encimsko kataliziranih stopnjah pretvori v kortizol. Prosta oblika kortizola zaradi svoje lipofilnosti zlahka prehaja celično membrano in tako vstopi v tarčno celico. Tam se veže na glukokortikoidne receptorje in nastanejo kompleksi hormon-receptor. Slednji se prenesejo v jedro in sprožijo sintezo ustreznih proteinov. Nastali proteini so posledica hormonskega odziva telesa na različne fiziološke (presnovni, protivnetni in imunosupresivni učinki) in patofiziološke procese. Opisana pot regulacije je pomembna za ohranjanje homeostaze ob stresu (3, 4).

Kortizol je sposoben regulirati tudi lastno izločanje, in sicer preko zaviranja hipotalamo-hipofizno-nadledvične stresne osi (negativna povratna zanka). Ob izpostavljenosti stresu se zviša koncentracija kortizola v krvi. Pri akutnem stresu ima kortizol pozitivne kratkotrajne učinke, kot sta pospešitev katabolnih procesov in dvig ravni energije, ki je potrebna za vzdrževanje homeostaze. Kronični stres privede do stalne stimulacije hipotalamo-hipofizno-nadledvične osi in konstantno zvišane koncentracije kortizola. Ta dogodek povzroči poškodbe nevronov hipokampusa in nepravilno delovanje te osi. Kronični stres je lahko dejavnik v razvoju psihičnih in psihosomatskih motenj oz. bolezni (3, 4).

1.3 MOTNJE V DELOVANJU NADLEDVIČNIH ŽLEZ

1.3.1 Cushingov sindrom

Cushingov sindrom je patološko stanje, ki nastane kot posledica kronične izpostavljenosti velikim količinam glukokortikoidov v krvi. Pri zdravem človeku je nivo kortizola zjutraj najvišji in zvečer najnižji. Povišana vrednost kortizola, ki ostane enakomerno visoka ves dan in ne pade v večernih urah, lahko kaže na Cushingov sindrom (2).

Najpogostejši razlog za nastanek bolezni je dlje časa trajajoče zdravljenje z glukokortikoidi (iatrogeni Cushingov sindrom), redkeje pa se pojavi spontano (neiatrogeni Cushingov sindrom). Klinični znaki so posledica številnih metabolnih manifestacij čezmernega izločanja glukokortikoidov. Značilna je centralna porazdelitev maščevja, kar se kaže v obliki okroglega luninega obraza, »bivoljega vratu« na zatilju in z zapolnjenostjo nadključničnih kotanj. Roke in noge so zaradi mišične atrofije, ki je posledica katabolnega delovanja glukokortikoidov, tanke in oslabiljene. Hkrati se pojavijo težave s povišanim krvnim tlakom, motnje v presnovi ogljikovih hidratov, mišična slabost, kožne podplutbe, akne in rdečica obraza, osteoporoza, izguba libida in potencia pri moških ter motnje menstrualnega ciklusa pri žen-



skah. Najpogostejša oblika zdravljenja je kirurška odstranitev hipofiznega tumorja, ki izloča ACTH ali kortizol (2, 5).

1.3.2 Primarna odpoved skorje nadledvičnih žlez ali Addisonova bolezen

Bolniki z Addisonovo boleznijo tožijo o utrujenosti (stopnjevanje tekom dneva), izgubi apetita in hujšanju zaradi bolečin v trebuhu, bruhanju in driski. Med zunanjimi znaki opazimo poudarjeno pigmentacijo kože in sluznic ter slabšo sekundarno poraščenost pri ženskah. Bolniki lahko imajo že leta nizek krvni tlak, predvsem sistolični tlak v pokončnem položaju. Prav tako so pogostejše izpostavljeni avtoimunskim boleznim. Akutno poslabšanje Addisonove bolezni imenujemo addisonska kriza. Sproži jo lahko okužba ali druga vrsta stresa. Bolniki z Addisonovo boleznijo imajo v serumu povišane koncentracije sečnine in kalija ter znižane koncentracije natrija. Zvišana sečnina in kalij sta posledica znižane glomerulne filtracije ob pomanjkanju glukokortikoidov, medtem ko pomanjkanje mineralokortikoidov privede do hiponatriemije in potencira hiperkaliemijo. Praviloma pride pri bolnikih še do blage normocitne normokromne anemije (2).

Pri bolniku z Addisonovo boleznijo kortizol po izvedbi hitrega testa ACTH ne poraste oz. poraste minimalno (5).

1.4 FUNKCIJSKI TESTI ZA OCENO DELOVANJA SKORJE NADLEDVIČNE ŽLEZE

S hormonskimi preiskavami določijo bazalno, suprimirano (z 8 mg deksametazona) ter stimulirano koncentracijo ACTH in kortizola v plazmi (preglednica 1).

Znižano oz. neustrezno koncentracijo serumskega kortizola dokažemo s hormonskim testom ACTH. Hitri test ACTH nam poda odgovor, ali je insuficienca nadledvične žleze prisotna ali ne, ne ločuje pa med primarno in sekundarno odpovedjo (posledica zmanjšane izločanja ACTH). Za to razlikovanje je treba izvesti večdnevni test ACTH (preglednica 1). Pri tem testu bolniku tri dni zapored apliciramo tetrakozaktid in preverjamo raven kortizola. Pri sekundarni

insuficienci skorje nadledvične žleze serumska koncentracija kortizola drugi ali tretji dan naraste, pri primarni insuficienci pa ostaja raven kortizola ves čas nespremenjena (popolna odpoved delovanja nadledvične žleze). Z dokončnim izčrpanjem nadledvične žleze lahko sprožimo addisonsko krizo. Pri odpovedi skorje nadledvične žleze je treba nadomeščati manjkajoči kortizol in po potrebi še mineralokortikoide. Najpogosteje pri tem uporabljamo hidrokortizon in fludrokortizon. Kakovost in pričakovana življenjska doba takšnega bolnika, ki redno prejema nadomestno zdravljenje in je poučen, kako ukrepati v stresnih situacijah, se ne razlikuje bistveno kot pri zdravem človeku (2).

2 TETRAKOZAKTID IN NJEGOVE NEČISTOTE

Tetrakozaktid je sintezni analog človeku lastnega ACTH. Oba stimulirata sproščanje kortizola iz skorje nadledvične žleze. Zgrajen je iz prvih 24 od 39 aminokislin telesu lastnega ACTH (slika 1). Tetrakozaktid ima osem bazičnih aminokislin in izoelektrično točko pri vrednosti 10,5, kar pomeni, da ima peptid v kislem mediju pozitiven naboj (5, 8).

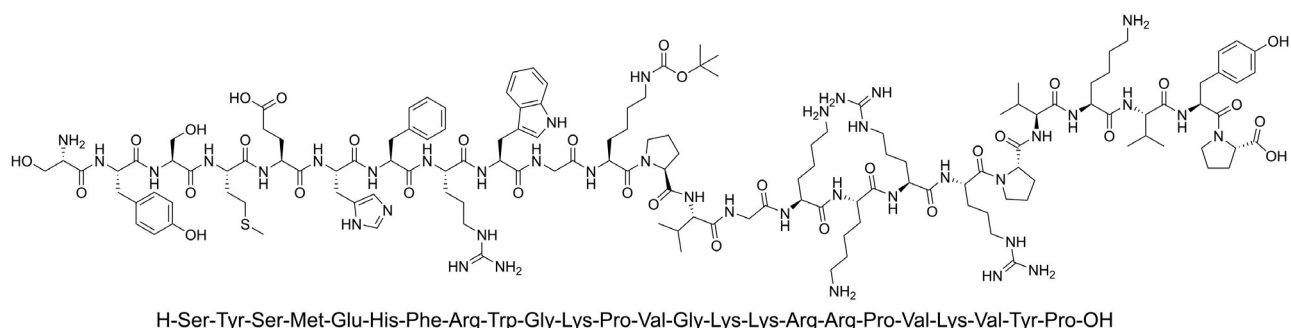
2.1 PRIPRAVA RAZTOPINE TETRAKOZAKTIDA V CENTRALNI LEKARNI UNIVERZITETNEGA KLINIČNEGA CENTRA MARIBOR TER UPORABA PRI PACIENTIH NA ODDELKIH

V Centralni lekarni UKC Maribor pripravljamo raztopino tetrakozaktida s koncentracijo 5 µg/mL v steklene vial. Redčenje industrijskega zdravila s tetrakozaktidom s fiziološko raztopino opravljamo po aseptičnem postopku. Raztopino nato glede na potrebe oddelkov polnimo v sterilne brizge, ki so kot takšne na voljo za takojšnjo aplikacijo. Tako vial kot brizge shranjujemo v hladilniku in na temnem. Na bol-

Preglednica 1: Funkcijski testi za oceno delovanja skorje nadledvične žleze (2).

Table 1: Adrenal function tests to evaluate the function of adrenal glands (2).

STIMULACIJSKI TESTI	SUPRESIJSKI TESTI
• Hitri test ACTH • Večdnevni test ACTH • Inzulinski tolerančni test • Metiraponski test	• Test z majhnim odmerkom deksametazona (1 mg) • Dvodnevni test z majhnim odmerkom deksametazona (2 mg) • Test z velikim odmerkom deksametazona (skupaj 8 mg)



Slika 1: Strukturna formula in aminokislinsko zaporedje tetrakozaktida.
Figure 1: Chemical structure and amino acid sequence of tetracosactide.

nišničnih oddelkih za izvedbo posameznega testa aplicirajo preiskovancu 1 µg tetrakozaktida.

V želji po izvedbi kontrole kakovosti prednapolnjenih brizg smo iskali primerno rutinsko analizo metodo. Analiza s fluorometrom Qubit 4 in Bradfordova metoda sta se izkazali za premalo občutljivi, analiza s tekočinsko kromatografijo ultra visoke zmogljivosti, sklopljena z masno spektrometrijo visoke ločljivosti (UHPLC-HRMS), pa je bila dovolj občutljiva, a predvsem zaradi svoje cenovne vrednosti oz. nedostopnosti ne spada med rutinske metode.

2.2 METODE ZA UGOTAVLJANJE KONCENTRACIJE TETRAKOZAKTIDA IN NJEGOVH NEČISTOT

Tetrakozaktid je po strukturi velik in kompleksen peptid, zato so za analizo potrebne dovolj občutljive metode, ki omogočijo ločitev in identifikacijo molekul tetrakozaktida in nečistot z različnimi naboji, primerjavo vzorcev tetrakozaktida, shranjenih v različnih vsebnikih in pri različnih pogojih, ter spremljanje razgradnje tetrakozaktida in identifikacijo nastalih nečistot.

V Evropski farmakopeji ima peptid svojo monografijo. S tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) so v referenčni raztopini tetrakozaktida zaznali prisotnost zgolj dveh nečistot. Do nastanka nečistote A pride na položaju 4, kjer se aminokislina metionin oksidira do sulfoksida. Druga nečistota B je najverjetneje diastereoizomer, ki se na mestu 16 pretvori iz *L*- v *D*-Lys-tetrakozaktid. Evropska farmakopeja predpisuje analizo s kolono, ki temelji na stacionarni fazi C18, dolžine 15 cm in premera 4,6 mm, pri pretoku 0,8 mL/min in pri 25 °C. Ločba je gradientna, v mobilnih

fazah A in B so v različnih deležih očetna kislina, acetonitril in amonijev sulfat, v mobilni fazi C pa samo acetonitril (6). Taichrib s sod. so s pomočjo analiznih metod reverznofazne tekočinske kromatografije visoke ločljivosti, sklopljene z masno spektrometrijo (RP-HPLC-MS), ter kapilarne elektroforeze, sklopljene z masnim detektorjem z analizatorjem na čas preleta ionov (CE-QTOF-MS), odkrili kar 41 nečistot tetrakozaktida. Primerjali so vsebnost nečistot pri različnih vzorcih (tri različne serije tetrakozaktida, pridobljene pri BfArM, en vzorec tetrakozaktida proizvajalca Bachem in en vzorec zdravila Synacthen®). Vzorce so tik pred analizo redčili do koncentracije 1,0 oz. 0,5 mg/mL z ultra čisto vodo. Kot je razvidno v preglednici 2, največji relativni delež nečistot poleg tetrakozaktid sulfoksida in *D*-Lys¹⁶-tetrakozaktida (diastereomer) predstavljajo še acetiliran tetrakozaktid (acetatna skupina stabilizira učinkovino) ter tetrakozaktid z zaščitnima skupinama *tert*-butil in *tert*-butiloksikarbonil. Nečistote z zaščitnimi skupinami so stranski produkti, ki nastajajo pri sintezi učinkovine. Majhen relativni delež predstavlja nečistoti tetrakozaktid + YSM in tetrakozaktid + SYSM, katerih masa je večja ravno za velikost aminokislinske sekvence, za 381 (YSM) oz. 468 (SYMS) Da. Nečistota 10-24 tetrakozaktid + G je zgrajena iz aminokislin od mesta 10. do 24. v molekuli tetrakozaktida z dodano aminokislinsko sekvenco G (7).

Industrijsko izdelano zdravilo Synacthen® je imelo podoben nabor in relativni delež nečistot kot ostali vzorci (BfArM, Bachem). Relativni deleži nečistot v industrijskem zdravilu pa so se precej razlikovali med metodama LC (tekočinska kromatografija) in CE (kapilarna elektroforeza). Strokovnjaki v članku so menili, da je razlog v nizki koncentraciji tetrakozaktida v Synacthen®, ki je znašala 250 µg/mL in da je za natančnejšo analizo vsebnosti nečistot potrebna višja koncentracija vzorcev (7).



Nadalje so ugotovili, da so z metodo CE učinkoviteje ločili nečistote z nižjo molekulsko maso in z metodo LC nečistote z višjo molekulsko maso. Za celotno analizo nečistot tetrakozaktida je bila potrebna kombinacija obeh metod (7). Tudi v doktorski disertaciji (8) so z analiznima metodama conske kapilarne elektroforeze, sklopljene z UV-spektrometrom, (CZE-UV) in conske kapilarne elektroforeze, sklopljene z masnim spektrometrom (CZE-MS), identificirali podoben nabor nečistot kot z zgoraj omenjenimi metodami. Poleg tetrakozaktida so detektirali še 16 razpadnih produktov, med drugim D-Lys-16-tetrakozaktid, tetrakozaktidov sulfoksid in stranske produkte sinteze tetrakozaktida. Žal podrobnejših informacij o vzorcu in analizi v nalogi niso razkrili.

3 VPLIV VSEBNIKA NA STABILNOST RAZTOPINE TETRAKOZAKTIDA

V strokovni literaturi najdemo različne podatke o vplivu vsebnika na stabilnost tetrakozaktida. Dickstein in sod. v članku (9) navajajo, da je raztopina tetrakozaktida v fiziološki raztopini, shranjena 2 uri pri 4 °C v steklenem vsebniku, stabilna le pri koncentraciji 5 µg/mL ali več. Nasprotno pa je raztopina, shranjena 2 uri pri 4 °C v plastičnem vsebniku, stabilna že pri koncentraciji 0,5 µg/mL. Raztopina s koncentracijo 5 µg/mL pa ostaja stabilna vsaj štiri mesece v obeh vrstah vsebnikov, saj koncentracija peptida do te ča-

Preglednica 2: Primerjava relativnih deležev AUC nečistot v različnih vzorcih tetrakozaktida (7).

Table 2: Comparison of relative proportions of AUC impurities in different samples of tetracosactide (7).

		BfArM – serija 1		BfArM - serija 2		BfArM – serija 3		SYNACTHEN®		Bachem	
Peptid	Masa ^a [Da]	Površina%									
		LC	CE	LC	CE	LC	CE	LC	CE	LC	CE
TCS	2931,5806	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
D-Lys-TCS	2931,5806	5,02	6,00	3,37	4,58	3,39	5,29	3,46	0,95	–	0,62
TCS + YSM	3312,7165	0,76	0,75	0,96	0,84	1,00	1,45	0,62	0,26	–	–
TCS + SYSM	3399,7485	1,14	1,10	1,52	1,31	1,45	2,23	1,04	0,35	–	–
Ac-TCS	2973,5912	1,56	1,82	1,08	1,28	1,76	3,13	0,54	0,25	–	–
tBu-TCS	2987,6432	14,59	20,51	14,82	19,16	14,24	26,13	11,02	6,36	0,29	–
tBoc-TCS	3031,6331	2,93	5,20	2,89	4,18	2,84	6,94	1,87	0,79	0,01	–
10–24 TCS+G	1765,0839	0,38	0,69	0,46	0,87	0,38	0,71	0,02	0,02	<0,01	–
TCS sulfoksid	2947,5756	0,83	5,72	1,48	2,88	0,80	4,33	1,58	10,28	5,06	6,60
Σ TCS ostalih nečistot		3,60	8,84	4,38	8,79	3,20	9,03	6,03	3,90	0,26	0,56

Legenda: a – izračunana monoizotopska masa; tBu-TCS – terc-butil tetrakozaktid; tBoc-TCS terc-butiloksikarbonil; Σ TCS ostalih nečistot – vsota nečistot tetrakozaktida, ki imajo skrajšano verigo na N- ali C-terminalnem delu peptida in predstavljajo majhen relativni delež; površina % – površina posameznih vrhov glede na površino vrha tetrakozaktida (relativni delež)

sovne točke pada počasi. V plastičnem vsebniku pade koncentracija tetrakozaktida za 25 %, v steklenem pa za 30 %. Strokovnjaki so opravili tudi testiranje *in vivo* na podganah in preverjali biološko aktivnost vzorcev. Dokazali so, da je učinek štiri mesece starih raztopin s koncentracijami od 0,5 do 5 µg/mL popolnoma enak učinku sveže pripravljene raztopine, saj so v enaki meri povzročile porast kortizola (9).

Murphy s sod. v svojem članku (10) trdi nasprotno. Po njihovih predvidevanjih je test ACTH v nizkih odmerkih izredno občutljiv na morebiten padec koncentracije tetrakozaktida v pripravljenih raztopinah. Pri prostovoljcih so izvedli hitri test ACTH z 1 µg testne raztopine, ki so jo preiskovancem aplicirali na različne načine. Ugotovili so, da je padec peptida v testni raztopini povezan z vrsto pripomočka, ki so ga uporabili za aplikacijo raztopine preiskovancu. Po njihovem mnenju naj bi se tetrakozaktid ob izpostavljenosti plastiki adsorbiral na njeno površino. V primeru aplikacije skozi 30 cm dolg venski set je znašala koncentracija v testni raztopini manj kot 30 % od pričakovane koncentracije.

4 REZULTATI PRELIMINARNIH POSKUSOV Z METODO TEKOČINSKE KROMATOGRAFIJE ULTRA VISOKE ZMOGLJIVOSTI, SKLOPLJENE Z MASNO SPEKTROMETRIJO VISOKE LOČLJIVOSTI

Z uporabo metode UHPLC-HRMS smo v vzorcu tetrakozaktida, pripravljenem v Centralni lekarni UKC Maribor, ločili in identificirali peptid in prisotne nečistote ter primerjali vzorce, shranjene v steklenih in plastičnih vsebnikih in pri različnih pogojih (hladilnik in tema, sobna temperatura in svetloba). Vzorce smo pripravili z redčenjem tetrakozaktida (v obliki zdravila Synacthen 0,25 mg/mL, Alfaisigma) s fiziološko raztopino do končne koncentracije 5 µg/mL. Kromatografsko analizo smo izvedli s kolono Acquity UPLC BEH C18, pri pretoku 0,4 mL/min in pri 40 °C. Kromatografski vrh za tetrakozaktid smo pričakovali pri 8,5 minute. Izvedli smo gradientno UHPLC s spreminjanjem elucijske moči mobilne faze. V mobilni fazi A je bila 0,1-odstotna raztopina mravljične kisline, v mobilni fazi B pa acetonitril.

Glavna prednost masnega spektrometra visoke ločljivosti je zmožnost identifikacije analita preko bruto formule in posledično identifikacija posameznih komponent oz. nečistot. Najvišjemu izotopu vsakega signala smo ob upoštevanju naboja molekule in ionizacije zaradi protoniranja (+ H⁺) izračunali molekulsko maso in podali bruto formulo molekule (slika 2 zgoraj).

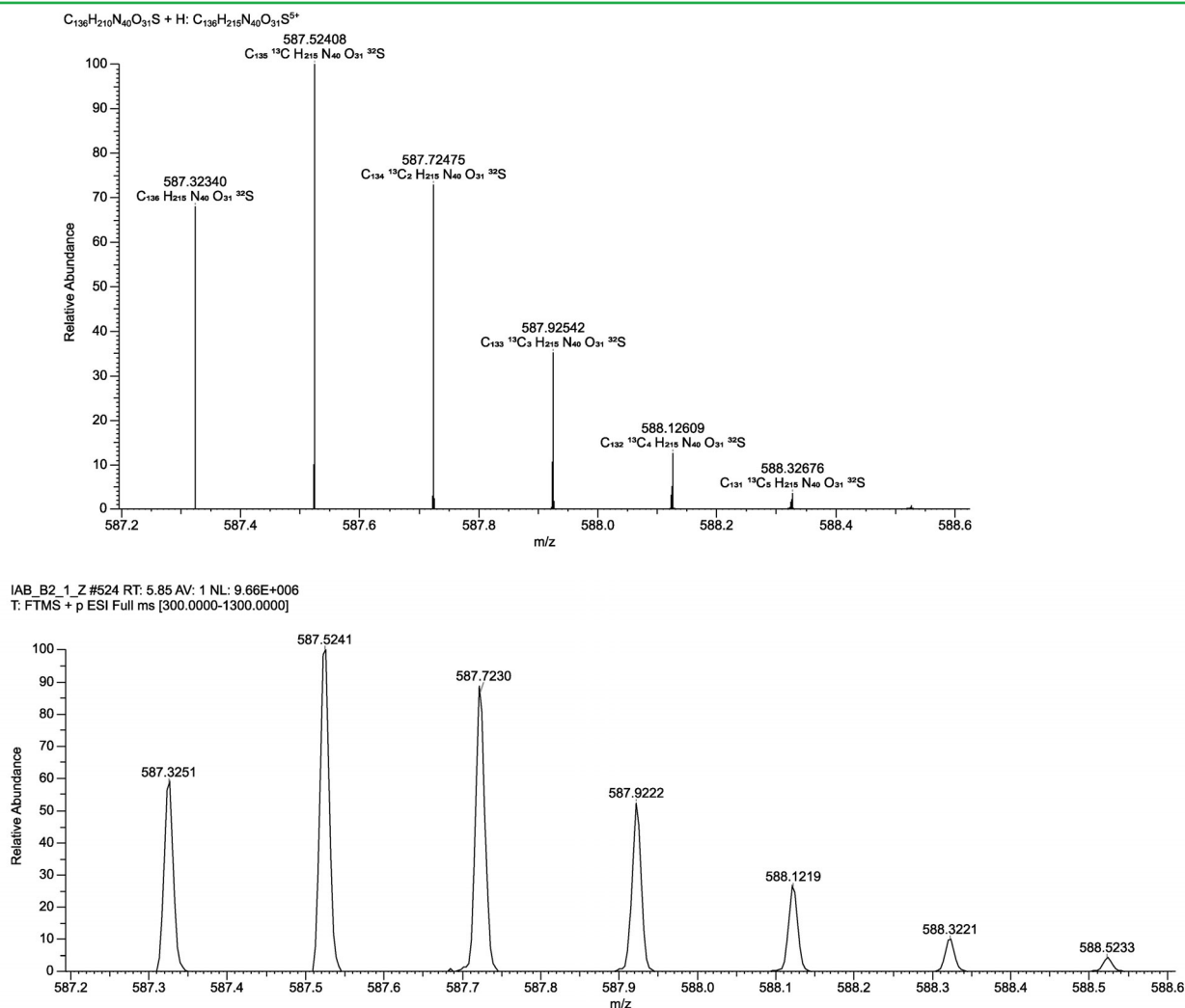
S pomočjo preliminarne testa (direktno injiciranje) smo določili enajst nečistot z maso, ki je večja ali manjša od molekulske mase tetrakozaktida za +16 Da, +32 Da, +48 Da, +53 Da, +54 Da, +64 Da, -16 Da, -43 Da, -202 Da, -234 Da in -250 Da. Molekula peptida ima v svoji strukturi osem bazičnih centrov, tako da lahko imajo tetrakozaktid in vsaka nečistota v kislem mediju še različen naboj, in sicer naboj +3, +4, +5, +6, +7 in +8, kar vodi do kompleksne sestave ustreznih signalov m/z. Upoštevajoč vse pripadajoče signale smo z dekonvolucijo izračunali molekulsko maso in bruto formulo ter tako identificirali učinkovino tetrakozaktid ali eno od nečistot.

Z namenom preverjanja zmožnosti analizne opreme smo vzorec s koncentracijo 5 µg/mL v plastični brizgi izpostavili sobni temperaturi in svetlobi za en mesec ter ga neposredno analizirali z metodo UHPLC-HRMS. Na sliki 3 vidimo skupek signalov (izotopska sestava) z nabojem +5 za tetrakozaktid (C₁₃₆H₂₁₀N₄₀O₃₁S) (najbolj intenzivna vrednost m/z = 587,524). Pri vrednosti m/z = 590,722 je viden močan signal za nečistoto tetrakozaktidov sulfoksid (C₁₃₆H₂₁₀N₄₀O₃₂S), pri vrednosti m/z = 593,921 je viden signal za dioksidirano nečistoto (C₁₃₆H₂₁₀N₄₀O₃₃S) in pri vrednosti m/z = 597,120 je viden šibek signal za trioksidirano nečistoto tetrakozaktida z nabojem +5 (C₁₃₆H₂₁₀N₄₀O₃₄S). Glavni del predstavljajo nečistote, ki nastanejo z oksidacijo molekule (mono-, di-, tri-, tetraoksidirana oblika nečistote).

S tem smo uspešno potrdili, da je metoda UHPLC-HRMS sposobna ločevati zelo podobne nečistote in hkrati tudi sposobna zaznati spremembe v sestavi razredčene raztopine tetrakozaktida. Naši rezultati bi lahko služili za razvoj in validacijo ustrezne analizne metode. Glavni zadržek je dostopnost aparature UHPLC-HRMS, ki zaradi svoje vrednosti in zahtevnosti ni primerna za rutinsko uporabo, in ni upravičeno pričakovati, da bi jo v doglednem času v kontrolnem laboratoriju Centralne lekarne UKC Maribor tudi pridobili.

Farmakopejska metoda, ki predpisuje analizo z aparaturo HPLC, je namenjena analizi čiste substance iz katere se pripravi vodna raztopina s koncentracijo 1 mg/mL. Metoda je zagotovo dostopnejša in primernejša za rutinsko analizo, a je za naše potrebe premalo občutljiva in selektivna. Te-





Slika 2: Izračunan (napovedan) masni signal (m/z) za petkrat nabito molekulo tetrakozaktida ($C_{136}H_{215}N_{40}O_{31}S^{5+}$) (zgoraj) in izmerjene eksperimentalne vrednosti vzorca (spodaj).

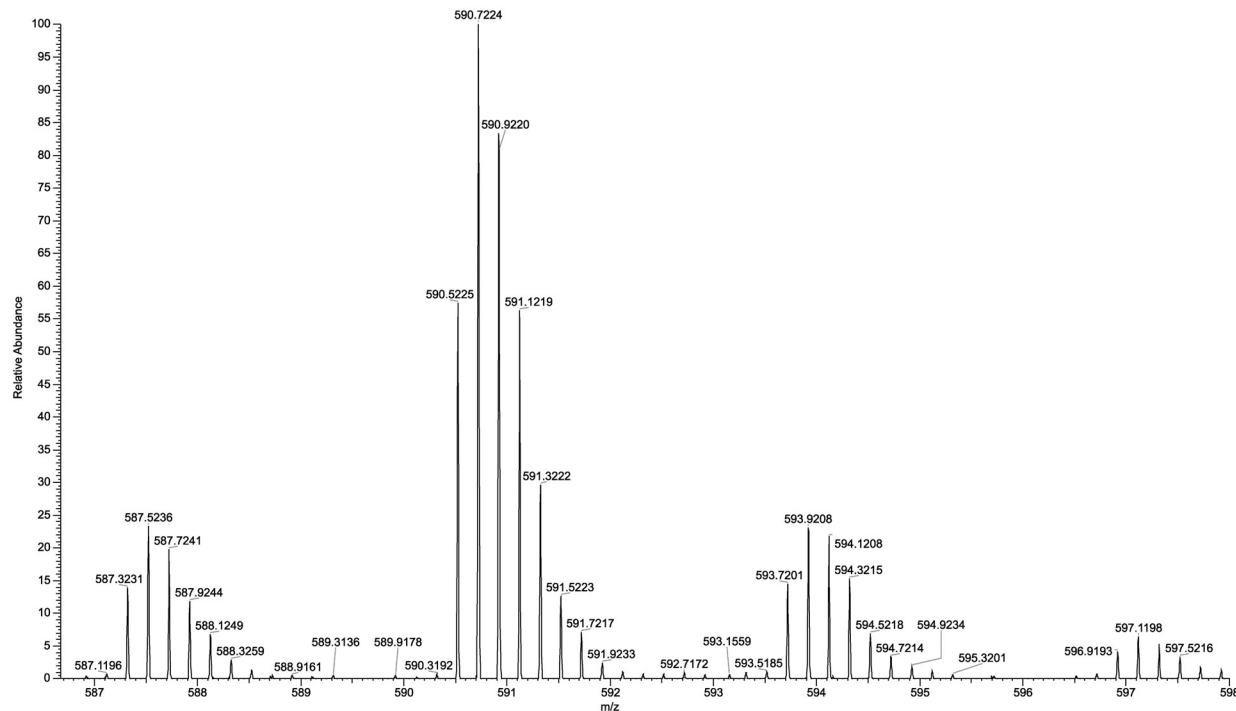
Figure 2: Calculated (predicted) mass signal (m/z) for the 5-fold charged molecule of tetracosactide ($C_{136}H_{215}N_{40}O_{31}S^{5+}$) (top) and measured experimental values of sample (bottom).

trakozaktida v testni raztopini s koncentracijo 5 µg/mL namreč z uporabo farmakopejske metode pri našem delu nismo zaznali.

5 SKLEP

Z izvedbo testa ACTH lahko na hiter in relativno enostaven način ugotovimo, ali je delovanje naših nadledvičnih žlez

pravilno ali ne. Zadostuje že obremenitev pacienta z 1 µg tetrakozaktida. V bolnišnicah najpogosteje uporabljamo že pripravljeno raztopino, katere stabilnost pa je odvisna od vrste vsebnika in pogojev shranjevanja. Glede na dobljene rezultate bi priporočali, da se raztopina tetrakozaktida kot polizdelek shrani v steklenem vsebniku, iz katerega jo nato tik pred aplikacijo ali na zalogo napolnimo v plastični vsebnik, kot so npr. prednapolnjene brizge. Raztopino moramo shranjevati v hladilniku in zaščiteno pred svetlobo. V UKC Maribor shranjujemo raztopino tetrakozaktida s koncentracijo 5 µg/mL v stekleni viali 4 mesece in v plastični brizgi 2 meseca.



Slika 3: Tetrakozaktid in nečistote z nabojem +5 vzorca shranjenega en mesec v plastičnem vsebniku na sobni temperaturi in svetlobi, posnet z metodo HRMS.

Figure 3: Tetracosactide and its impurities with a charge +5 of the sample in a plastic container stored one month at room temperature and exposed to light analysed with HRMS.

6 LITERATURA

- Osredkar J. Izbrana poglavja iz klinične kemije. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2008: 16, 18, 86, 19-25, 42-46
- Kocijančič A., Mrevlje F. Interna medicina. Državna založba Slovenije, Ljubljana 2005: 850-859
- Smith SM, Vale WW. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 2006 Dec;8(4):383-95
- Do YupL., Eosu K., Man Ho C. Technical and clinical aspect of cortisol as a biochemical marker of chronic stress. *BMB Reports*, 2015; 45(4):209-206
- Kocijančič A. Endokrinologija. Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1987: 6, 23-40, 205, 206, 319-324
- Council Of Europe, European Pharmacopoeia Commission, European Directorate For The Quality Of Medicines & Healthcare. European pharmacopoeia. Strasbourg: Council Of Europe; 2019.
- Taichrib A, Gerhard, Neusüß C. Identification and characterization of impurities of tetracosactide by capillary electrophoresis and liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*/Analytical & bioanalytical chemistry. 2011 Jul 6;401(4):1365-75.
- Ludewig DiplP. Elektromigrationsverfahren in der Peptidanalytik Trennung von diastereomeren Peptiden mittels Kapillarelektrochromatographie und Entwicklung eines kapillarzonenelektrophoretischen Enzym-Assays für Sirtuine [Internet]. [cited 2024 May 21]. Available from: <https://core.ac.uk/download/pdf/224755898.pdf>
- Dickstein G, Shechner C, Nicholson We, Rosner I, Sheen-orr Z, Adawi F, et al. Adrenocorticotropin Stimulation Test: Effects of Basal Cortisol Level, Time of Day, and Suggested New Sensitive Low Dose Test*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1991 Apr;72(4):773-8.
- Murphy H, Livesey J, Espiner EA, Donald RA. The Low Dose ACTH Test—A Further Word of Caution. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*/Journal of clinical endocrinology & metabolism [Internet]. 1998 Feb 1 [cited 2024 May 20];83(2):712-3. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article/83/2/712/2865740>
- Mandal A. What is Addison's Disease? [Internet]. News-Medical.net. 2018. Available from: <https://www.news-medical.net/health/What-is-Addisons-Disease.aspx>
- Mayo Clinic. Cushing syndrome - symptoms and causes [Internet]. Mayo Clinic. Mayo Clinic; 2023. Available from: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/cushing-syndrome/symptoms-causes/syc-20351310>

