

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2014

Р. Г. Глушков¹, М. С. Гойзман², Д. А. Аранцева², Н. Н. Демидова², Е. К. Кулаева², М. Б. Загудайлова², Д. Е. Дмитриев³, А. С. Трифиленков³, А. А. Корлюков⁴, Д. Е. Архипов⁴, К. Ю. Супоницкий⁴, Н. Л. Шимановский⁵, С. А. Зайцев⁶, Е. В. Дегтерев⁷

АТРОПОМЕРНЫЙ СОСТАВ ЙОПРОМИДА КАК КРИТЕРИЙ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ЕГО СУБСТАНЦИИ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

¹ Российская академия медицинских наук, Москва, ул. Солянка, д. 14, Россия; e-mail: ramn@ramn.ru.

² ООО "Технология лекарств", Химки, Московская обл., Рабочая ул., д. 2а, Россия; e-mail: goizmanmi@gmail.com;

³ ЗАО "Исследовательский институт химического разнообразия", Химки, Московская обл., Рабочая ул., д. 2а, Россия; e-mail: atr@iir.ru;

⁴ УРАН "Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова", Москва, ул. Вавилова д. 28, Россия; e-mail: kirshik@yahoo.com;

⁵ ГБОУ ВПО "РНИМУ им. Н. И. Пирогова" Минздрава, Москва, ул. Островитянова, 1, Россия; e-mail: shimannn@yandex.ru;

⁶ ЗАО "ИНФАРМА", Томск, ул. Елизаровых д. 79/4, Россия; e-mail: arnab56@yandex.ru;

⁷ ООО "Фолиум", а/я 42, Москва, Россия; e-mail: chem@folium.ru

Рассмотрен атропомерный состав субстанции и препаратов йопромида. Показано, что при 120 °С в водных растворах йопромида его атропомеры переходят в конформеры, между которыми при этой температуре по истечении 15 мин устанавливается равновесие. Следовательно, атропомерный состав субстанции йопромида при описанной технологической обработке полученных из неё растворов не может препятствовать достижению в них равновесия между конформерами, образующимися при 120 °С. Равновесный состав таких растворов сохраняется после охлаждения, т.е. после обратного перехода конформеров в состояние атропомеров. Показано, что реально важным критерием качества препаратов йопромида является суммарное относительное содержание в них (в терминах USP) $E1$ и $E2$ атропомеров (ΣE), ибо только выполнение неравенства $\Sigma E \geq 20\%$ гарантирует в широком диапазоне температур (от 0 до 120 °С) фазовую устойчивость растворов с рабочими концентрациями йопромида ≤ 769 мг/мл. Выполнение неравенства $\Sigma E \geq 20\%$ неизбежно достигается при термической стерилизации препаратов йопромида.

Ключевые слова: йопромид; конформер; атропомер; тонкослойная хроматография (ТСХ); высоко эффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ); протонный магнитный резонанс (ПМР); рентгенодифракционное исследование; квантовая химия; конформационное исследование.

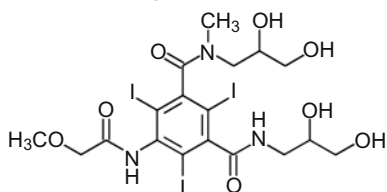
Широко применяемые в медицине неионогенные рентгеноконтрастные вещества [1], структурные формулы, международные непатентованные и химические названия которых приведены ниже, имеют в молекулах асимметрические атомы углерода. В молекуле йопромида их 2, в молекуле йогексола — 3.

Наличие 2 или более асимметрических атомов в молекуле вещества обуславливает возможность существования не только его энантиомеров, но и диастереомеров. Йопромид и йогексол в организме человека не подвергаются метаболизму. Оба они, введенные внутривенно, распределяются преимущественно во внеклеточном пространстве, слабо связываются с белками плазмы и быстро выводятся из организма почками в неизменном виде (более 92 % за 1 сут). Это подтвер-

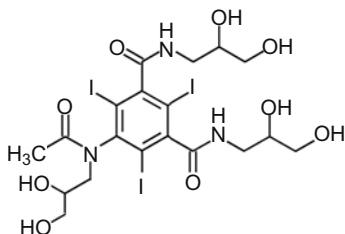
ждает отсутствие фармакологически обоснованной необходимости нормирования относительных содержаний оптических изомеров в йопромиде, йогексоле и им подобных фармацевтических субстанциях и соответствующих лекарственных формах. Более того, близость фармакологических свойств йопромида и йогексола, имеющих разные химические структуры, позволяет считать, что изменения относительных содержаний конформеров или атропомеров в растворах йопромида в принципе не могут влиять на фармакологические и рентгеноконтрастные свойства последних. Тем не менее с физико-химической точки зрения вопрос о целесообразности нормирования в йопромиде и его лекарственных формах относитель-

ных содержаний атропомеров нуждается в особом рассмотрении [2, 3].

Наряду с 2 асимметрическими атомами углерода в 2,3-дигидроксипропильных группах молекула йопромида может иметь другие элементы асимметрии. В частности, могут оказаться хиральными оси, проходящие через атомы углерода 1 – 4, 2 – 5 и 3 – 6 базисного 2,4,6-трийодбензольного фрагмента молекулы. Так будет в случае затруднённого вращения заместителей в положениях 1, 3 и 5 этого фрагмента: *N*-(2,3-дигидроксипропил)-*N*-метил- и *N'*-(дигидроксипропил)карбоксамидных, а также метоксиацетиламинового. Например, *N*-(2,3-дигидроксипропил)-*N*-метилкарбоксамидный заместитель в положении 1 может располагаться по разные стороны плоскости бензольного кольца, образуя тем самым пару конформеров (атропомеров), взаимопревращения которых, связанные с вращением вокруг связи C–C(O), требуют преодоления достаточно высоких энергетических барьеров. Кроме того, в этом же заместителе затруднено вращение вокруг связи (O)C–N(CH₃), что обуславливает вероятность амидной *Z,E*-конформомерии [3], называемой так согласно стереохимической классификации конформеров. Высокие значения энергетических барьеров между возможными конформерными структурами молекулы йопромида обусловлены тем, что атомы йода, находящиеся в *орто*-положениях к каждому из *N*-содержащих заместителей, имеют ковалентный радиус, равный 1,35 Å, т.е. превышающий ковалентный радиус атома водорода более чем в 4 раза [4], что может затруднять вращение не только вокруг связей C–C(O) и C–N(H), но и вокруг связей (O)C–N(CH₃) и (H)N–C(O).



Йопромид (C₁₈H₂₄I₃N₃O₈; молек. масса 791,1), *N,N'*-бис(2,3-дигидроксипропил)-2,4,6-трийод-5-[(метоксиацетил)амино]-*N*-метил-1,3-бензолдикарбоксамид



Йогексол (C₁₉H₂₆I₃N₃O₉; молек. масса 821,1), 5-[ацетил(2,3-дигидроксипропил)амино]-*N,N'*-бис(2,3-дигидроксипропил)-2,4,6-трийод-1,3-бензолдикарбоксамид

Пара конформеров, как таковая, существует, если энергетические барьеры не препятствуют взаимопревращениям конформеров и со временем между ними устанавливается динамическое равновесие. В настоящей работе экспериментально показано, что в процессе термической стерилизации (120 °С, 15 мин) в растворах йопромида достигаются равновесные концен-

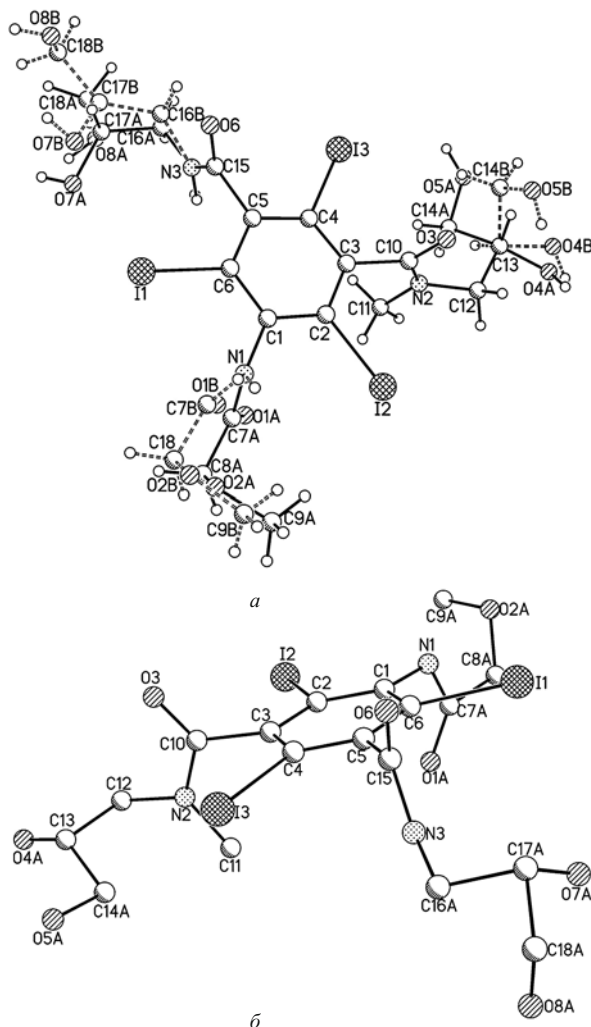
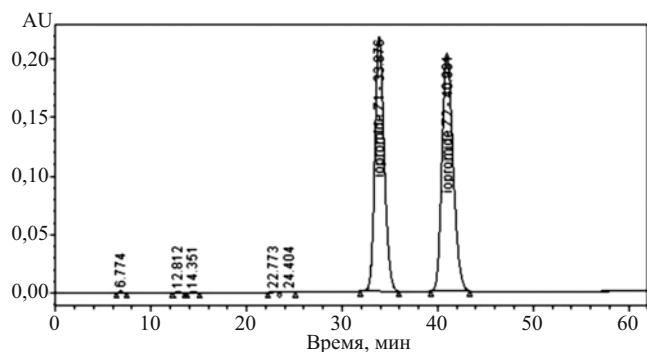


Рис. 1. Общий вид молекулы йопромида: а) схема разупорядочения (связи вторых компонентов разупорядоченных фрагментов даны пунктиром); б) атомы водорода и вторые компоненты разупорядоченных фрагментов молекулы опущены.

трации конформеров, остающиеся постоянными (уже для атропомеров) после охлаждения растворов при условии их сохранения, как однофазных систем. Следовательно, рассматривая возможности нормирования методом ВЭЖХ относительных содержаний атропомеров в субстанции йопромида и в его лекарственных формах, приходится констатировать, что в субстанции, как в твёрдом веществе, оно трудновыполнимо, а для термически стерилизованных лекарственных форм — не имеет смысла. Объясняется это тем, что при временном повышении температуры растворов йопромида, достаточном для преодоления энергетических барьеров, мешающих переходам пар атропомеров в пары соответствующих конформеров, и для установления равновесия между конформерами относительные содержания последних в растворах становятся равновесными, заданными *a priori*, и далее уже не зависящими от температуры. Термин “конформеры” можно считать обобщающим, ибо для экспериментального установления границы между температурными интервалами существования конформеров и атропомеров необходимо с кинетических позиций выбрать

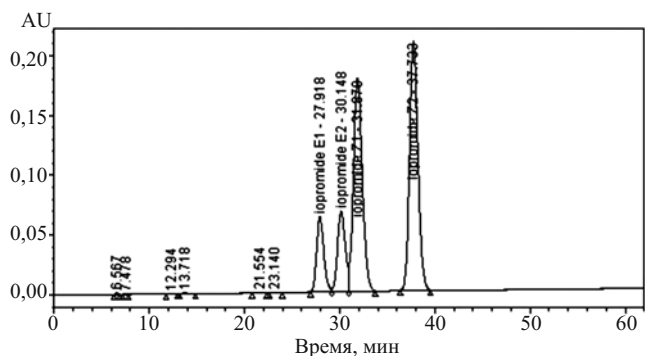


	Peak Name	RT	Area	% Area
1		6,774	33671	0,11
2		12,812	16258	0,05
3		14,351	19437	0,06
4		22,773	5583	0,02
5		24,404	15163	0,05
6	iopromide E1	29,000		
7	iopromide E2	31,000		
8	iopromide Z1	33,876	14693599	47,06
9	iopromide Z2	40,981	16441842	52,66

Рис. 2. ВЭЖ-хроматограмма раствора стандарта (22,5 мкг йопромида; найдено $\Sigma E = 0\%$).

определённый критерий, но условия выбора пока не унифицированы [3].

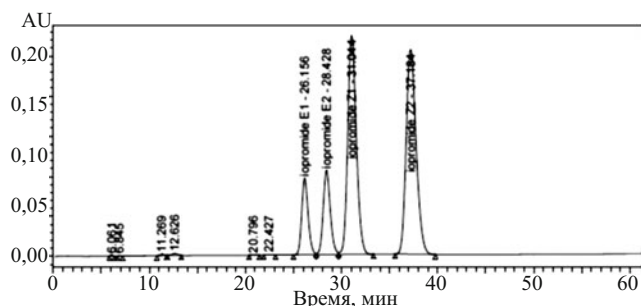
С учётом сказанного представляется не вполне оправданным, что в Фармакопее США в монографиях на субстанцию и растворы йопромида [2] атропомерный состав последнего предлагается нормировать при 20 °C в растворах испытуемых объектов с использованием ВЭЖХ не одинаково, как то описано в разделах, названных “Isomer distribution” (“Распределение изомеров”). Относительные содержания изомеров (атропомеров), обозначенных как E1, E2, Z1 и Z2, в монографии на субстанцию нормируют без указания цели в полученном из неё испытуемом растворе попарно: сумму содержаний E1 и Z1 в пределах от 40 до 51 %, а сумму содержаний E2 и Z2 в пределах от 49 до 60 %. Результаты анализа рассчитывают методом нормировки, принимая содержание всех атропомеров равным 100 %. Ясно, что в этом случае достаточно было нормировать лишь одну из указанных сумм, пусть и без рассмотрения цели нормирования. Без такого рассмотрения полученная информация представляется бесполезной — она не позволяет оценить пригодность испытуемой субстанции для непосредственного использования в качестве компонента инъекционных растворов, поскольку в них, согласно [2], относительные содержания каждого из 4 атропомеров предлагается нормировать уже по отдельности в пределах: E1 — от 8,0 до 12,0 %, E2 — от 9,0 до 14,0 %, Z1 — от 32,0 до 40,0 %, Z2 — от 38,0 до 46,0 %. Такой подход, в свою очередь, не приводит к получению информации, необходимой для оценки качества растворов йопромида, предназначенных для парентерального введения, т.к. реально важным критерием качества этих растворов является относительное суммарное содержание в них



	Peak Name	RT	Area	% Area
1		6,567	24435	0,08
2		7,478	7509	0,02
3		12,294	12860	0,04
4		13,718	22995	0,07
5		21,554	15891	0,05
6		23,140	12139	0,04
7	iopromide E1	27,918	3216024	10,27
8	iopromide E2	30,148	3729660	11,91
9	iopromide Z1	31,870	11593651	37,04
10	iopromide Z2	37,733	12669295	40,47

Рис. 3. ВЭЖ-хроматограмма раствора стандарта, термически обработанного (15 мин, 120 °C; 22,5 мкг йопромида; найдено $\Sigma E = 22,2\%$).

E1 и E2 атропомеров (ΣE), ибо только выполнение неравенства $\Sigma E \geq 20\%$ гарантирует в широком диапазоне температур (от 0 до 120 °C) фазовую устойчивость растворов с концентрациями йопромида ≤ 769 мг/мл. Независимо от атропомерного состава исходной субстанции выполнение для её растворов указанного неравенства неизбежно достигается в процессе их термической стерилизации, т.е. в условиях, когда энергетические барьеры не мешают быстрому установлению равновесия между всеми возможными конформерами йопромида (атропомеры в этих условиях не существуют). В твёрдом состоянии, даже при 120 °C, обычно аморфная субстанция йопромида представляет собой смесь двух (Z1, Z2) или максимально четырёх (Z1, Z2, E1, E2) атропомеров. Приготовленные при комнатной температуре испытуемые растворы таких субстанций контролируют согласно [2] методом ВЭЖХ при 20 °C. Они должны содержать суммарно от 40 до 51 % конформеров E1 и Z1 в пересчёте на йопромид (принимается, что $E1 + Z1 + E2 + Z2 = 100\%$). Но при термической стерилизации конформерный состав йопромида в растворах резко меняется, приближаясь к равновесному, что делает его оценку при первичном анализе субстанций излишней. С целью подтверждения сказанного строение атропомеров йопромида и процессы, протекающие в его растворах, будут подробно рассмотрены ниже. Для этого и для выбора целесообразных подходов к нормированию относительного содержания атропомеров в испытуемых растворах субстанции йопромида при первичном анализе, а также в его готовых лекарственных формах, подвергнутых термической стерилизации, нами поставлены эксперименты с использованием ряда физико-химических ме-



	Peak Name	RT	Area	% Area	Resolution
1		6,061	22317	0,05	
2		6,845	6686	0,01	1,998912
3		11,269	47932	0,11	8,059027
4		12,626	90539	0,20	1,462387
5		20,796	12844	0,03	8,405718
6		22,427	11038	0,02	1,794146
7	iopromide E1	26,156	4425765	9,76	3,424288
8	iopromide E2	28,428	5389256	11,88	1,800181
9	iopromide Z1	31,044	16884005	37,23	1,781076
10	iopromide Z2	37,184	18455502	40,70	3,497258

Рис. 4. ВЭЖ-хроматограмма испытуемого раствора препарата “Ультрависта 370” (~ 31,5 мкг йопромид; найдено $\Sigma E = 21,6\%$).

тодов анализа и проведен расчёт конформационных энергий в изолированной молекуле йопромид.

Рентгенодифракционное исследование йопромид

Методика эксперимента. При получении монокристаллов использовали аморфный йопромид, отвечающий требованиям [2], не содержащий E1 и E2 атропомеров. Монокристаллы получены испарением 10 % раствора йопромид в метаноле при 20 °С. Найдено, что эти кристаллы являются триклинными. Пространственная группа P-1; $a = 10,1652(10)$ Å; $b = 10,6542(11)$ Å; $c = 12,0436(12)$ Å; $\alpha = 77,212(2)^\circ$; $\beta = 87,495(2)^\circ$; $\gamma = 82,170(2)^\circ$; $V = 1260,0(2)$ Å³; $Z = 2$; $M = 791,10$. В работе использовался дифрактометр Bruker Smart APEX DUO [100 K; $\lambda(\text{MoK}\alpha) = 0,71073$ Å; ω -сканирование, $2\theta < 59,2^\circ$]. Полученные 3 серии фреймов, соответствующие половине сферы обратного пространства, обработаны по программе APEX2 and SAINT [5] и усреднены с использованием программы SADABS [6]. Всего было собрано 16006 отражений, а 7010 независимых отражений ($R_{\text{int}} = 0,0248$) использованы для дальнейшего уточнения. Структура решена прямым методом и уточнена в полноматричном анизотропном приближении по F². Уточнение структуры разупорядоченных заместителей проводили с использованием идеализированных значений длин связей N–C, C–C и O–C по данным Кембриджского банка структурных данных [7]. Положения атомов водорода амидных, метильных и метиленовых групп рассчитаны, исходя из геометрических соображений, и уточнены с ограничениями, наложенными на эквивалентный тепловой параметр и длины связей C–H и N–H. Положения атомов водорода гидроксильных групп рассчитывались с использованием

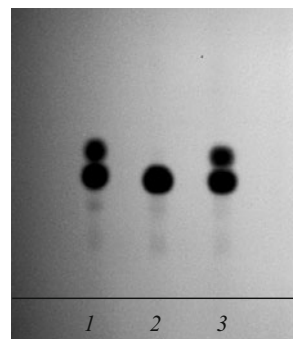


Рис. 5. Фрагмент пластинки с ТС-хроматограммами растворов 1, 2 и 3.

данных о кратчайших межмолекулярных расстояниях O...O. Окончательные факторы расходимости: $wR_2 = 0,1917$ (по всем отражениям), $R_1 = 0,0717$ [по 3309 отражениям с $I > 2\sigma(I)$], $\text{GOF} = 1,040$. Расчеты выполнены с использованием программного комплекса SHELXTL PLUS, ver. 5.10 [8]. Координаты атомов и температурные факторы депонированы в Кембриджском банке структурных данных (CCDC) № 969110; <http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/csd/request/>.

Установлено, что все амидные фрагменты молекулы йопромид расположены по одну сторону плоскости бензольного кольца и имеют по стереохимической классификации Z-конфигурацию (рис. 1). Из-за присоединения амидных групп к бензольному циклу по С или N атомам имеются различия в положениях соответствующих карбонильных групп: атомы O3 и O6 карбонильных групп 1,3-карбоксамидных заместителей расположены по одну сторону плоскости бензольного кольца, тогда как атом O1 метоксиацетинового заместителя расположен по другую сторону этой плоскости. Анализ разностных Фурье-синтезов электронной плотности свидетельствует, что алкильные цепи, включающие асимметрические центры C13 и C17, и гидроксильные группы всех заместителей разупорядочены. Для уточнения положений атомов алкильных цепей и гидроксильных групп использована модель, описывающая конфигурацию йопромид как суперпозицию R,R и R,S-диастереомеров с равной заселенностью. С учетом centrosymmetrichности пространственной группы в структуре также присутствуют и энантиомеры (S,S и S,R). Установлено, что в монокристалле йопромид по классификации, принятой в [2], присутствует только 1 его атропомер — Z2.

Изучение растворов йопромид методами ВЭЖХ и ТСХ.

Методика эксперимента (ВЭЖХ). Условия хроматографирования: колонка — 4,6 мм × 250 мм Hypersil ODS C₁₈ (5 мкм); температура 20 °С. Детектор — УФ, 254 нм. Объем пробы — 10 мкл. Расход подвижной фазы (ПФ) — 1,2 мл/мин.

ПФ. В колбу с притёртой пробкой объемом 2 л помещали 5 мл хлороформа и 74 мл метанола. Колбу выдерживали 10 мин в ультразвуковой бане, прибавляли 900 мл воды и вновь выдерживали в ультразвуковой

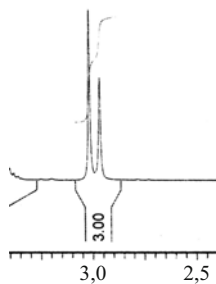


Рис. 6. ПМР спектр раствора стандартного образца йопромида. (сигналы *N*-метильных групп).

бане до растворения хлороформа (~ 30 мин), периодически встряхивая колбу вручную. Фазу фильтровали через мембранный фильтр (0,22 мкм) и дегазировали [3, 4].

Раствор стандарта. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещали 25 мг (точная навеска) йопромида стандартного образца (USP RS; CAS № 73334-07-3), растворяли в 9 мл подвижной фазы. Доводили объём раствора подвижной фазой до метки, перемешивали. Высокоэффективная жидкостная хроматограмма (ВЭЖ-хроматограмма) этого раствора приведена на рис. 2.

Раствор стандарта, термически обработанный. Во флакон вместимостью 10 мл помещали 5 мл раствора стандарта, флакон герметизировали, выдерживали при 120 °С в течение 15 мин и охлаждали до 20 – 25 °С. ВЭЖ-хроматограмма этого раствора приведена на рис. 3.

Испытуемый раствор препарата “Ультравист 370”; Байер Шеринг Фарма АГ, Германия. Точную навеску ~ 1,4 г препарата (~ 0,769 г йопромида) помещали в мерную колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 200 мл подвижной фазы, выдерживали на ультразвуковой бане до полной гомогенизации, доводили объём раствора подвижной фазой до метки, перемешивали. ВЭЖ-хроматограмма этого раствора приведена на рис. 4.

На ВЭЖ-хроматограммах (рис. 2 – 4) на единицу суммарной площади пиков атропомеров йопромида соответственно приходится по $72 \cdot 10^{-8}$, $72 \cdot 10^{-8}$ и $\sim 70 \cdot 10^{-8}$ мкг йопромида. Попарное сравнение первой из этих величин со второй и третьей говорит о близости удельных показателей поглощения атропомеров йопромида и свидетельствует о возможности его количественного спектрофотометрического определения в растворах без учёта атропомерного состава.

Методика эксперимента (ТСХ). Готовили 50 % водный раствор йопромида стандартного образца (USP RS; CAS № 73334-07-3) (раствор А) и затем — растворы 1, 2 и 3 для изучения их методом ТСХ.

Растворы 1 и 2 готовили при 20 – 25 °С. Они содержали: первый — 58 мг препарата “Ультравист 300” (Байер Шеринг Фарма АГ), второй — 58 мг раствора А и оба — по ~ 1,4 мл метанола [24 мкл CH_3OH на 1 мг препарата “Ультравист 300” или раствора А].

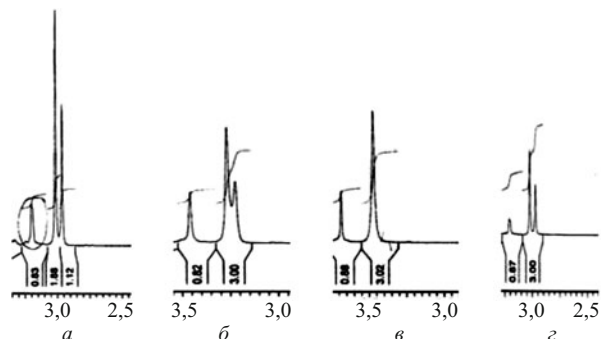


Рис. 7. Сигналы *N*-метильных групп в ПМР спектрах 1,5 % раствора йопромида серии 1 в D_2O : а, б, в — снято соответственно при 30, 50 и 70 °С; з — снято после охлаждения до 30 °С раствора, выдержанного 30 мин при 70 °С.

Раствор 3 готовили из 58 мг раствора А, навеску выдерживали в запаянной стеклянной ампуле в течение 15 мин при 120 °С. После охлаждения до 20 – 25 °С в ампулу вводили ~ 1,4 мл метанола (24 мкл CH_3OH на мг раствора А).

По 5 мкл растворов 1, 2 и 3 (по ~ 100 мкг йопромида) наносили отдельными полосами (3 мм) на линию старта хроматографической пластинки Kieselgel 60 F_{254} (Merck) размером 10 × 15 см с толщиной слоя 0,25 мм. Пластинку сушили на воздухе в течение 30 мин. Хроматографировали восходящим способом в камере, насыщенной парами свежеприготовленной подвижной фазы (муравьиная кислота безводная — вода — метанол — хлороформ; 1:3:16:31 по объёму). После прохождения фронтом фазы 12 см пластинку сушили на воздухе. Пятна открывали при просмотре в УФ-свете (254 нм). Фотография в УФ-свете пластинки с тонкослойными (ТС)-хроматограммами растворов 1, 2 и 3 представлена на рис. 5.

Таким образом, методами ВЭЖХ и ТСХ показано, что в описанных растворах йопромид может существовать в виде 2 или, после выдержки при 120 °С, 4 разных атропомеров. Равновесие между последними, как между конформерами, устанавливается в условиях стерилизации, т.е. за 15 мин при 120 °С (хроматограммы растворов 1 и 3 на рис. 5 идентичны). Отметим, что пятна на хроматограммах растворов 1 и 3 (в порядке возрастания величин R_f) принадлежат атропомерам *Z* и *E* в терминах [2], а единственное пятно на хроматограмме раствора 2, с учётом величины R_f , следует считать пятном *Z* атропомеров. Сравнение ВЭЖ-хроматограммы (рис. 2) с ТС-хроматограммой раствора 2 (рис. 5) показывает, что в последнем присутствуют оба *Z* атропомера, но на ТС-хроматограмме они не делятся — на ней имеется лишь 1 пятно.

Сравнение ВЭЖ-хроматограмм (рис. 3 и 4) с ТС-хроматограммами растворов 1 и 3 (рис. 5) позволяет утверждать, что в растворах 1 и 3 присутствуют в терминах [2] оба *Z* и оба *E* атропомера, хотя на соответствующих ТС-хроматограммах это не фиксируется, на каждой из них имеется, как указано выше, только по 2 пятна (первое *Z*, а второе — *E* атропомеров). Для предварительной идентификация атропомеров доста-

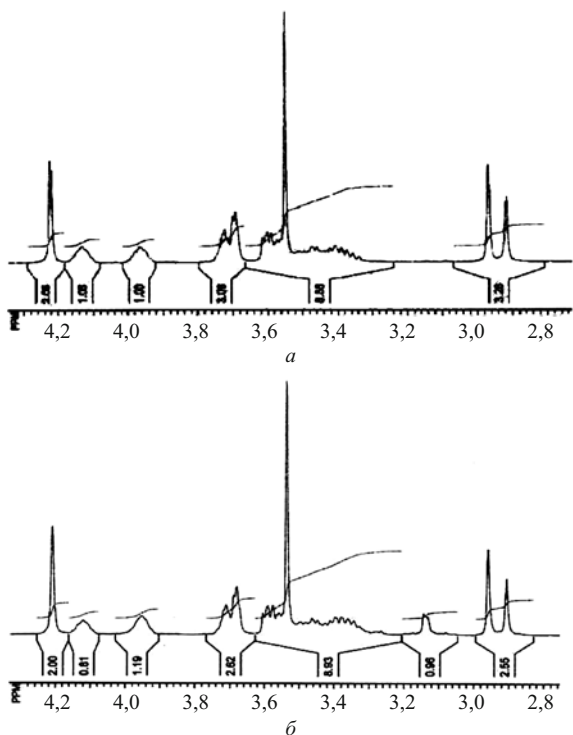


Рис. 8. ПМР спектры 1,5 % раствора субстанции йопромида серии 2 в D_2O : *a* — непосредственно после растворения, найдено $\Sigma E = 0$ %; *b* — через 1 ч после стерилизации и охлаждения до 20 °С, найдено $\Sigma E = 27,4$ %.

точно сравнения рис. 3 и 4, поскольку на последнем представлена хроматограмма препарата “Ультравист-370”, отвечающего требованиям [2]. На этой хроматограмме есть идентифицированные пики всех 4 атропомеров.

Следовательно, методами ВЭЖХ и ТСХ подтверждено, что йопромид в растворах (в процессе их термической обработки) образует равновесную систему, содержащую ~ 22 % *E* конформеров в пересчёте на йопромид.

Ниже идентификация конформеров (атропомеров) проведена методом протонного магнитного резонанса (ПМР). Кроме этого, рассмотрены результаты рентгенодифракционных исследований и квантовохимической оценки величин энергетических барьеров между конформерами.

Изучение растворов йопромида методом ПМР

Методика эксперимента. Изучали влияние температуры на скорость взаимопревращений конформеров в растворах йопромида в интервале от 25 до 70 °С (растворители: D_2O и 0,9 % раствор NaCl в D_2O). Рабочие растворы готовили из субстанций йопромида серий 1 и 2, отвечающих требованиям [2], а также из йопромида стандартного образца (USP RS; CAS № 73334-07-3). Важно отметить, что ТС-хроматограмма субстанции серии 1 подобна хроматограммам 1 и 3 на рис. 5, т.е. для этой субстанции $\Sigma E > 0$ %. Методом ВЭЖХ найдено, что в растворе этой субстанции $\Sigma E = 15,3$ %. Напротив, ТС-хроматограмма субстан-

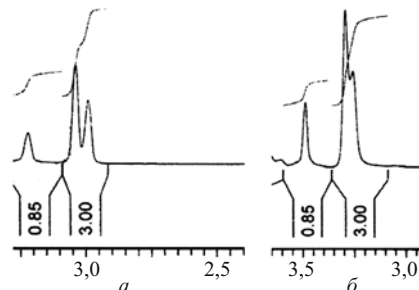


Рис. 9. Сигналы *N*-метильных групп в ПМР спектрах 1,5 % раствора йопромида серии 1 в 0,9 % растворе NaCl в D_2O : *a* — при 30 °С; *b* — при 50 °С.

ции серии 2 подобна хроматограмме 2 на рис. 5, т.е. в этой субстанции *E* атропомеры отсутствуют, для неё $\Sigma E = 0$ %. Концентрация рабочих растворов составляла ~ 1,5 %. При необходимости предварительная выдержка растворов при 120 °С осуществлялась в запаянных ампулах. Прибор — Bruker DPX-300.

Рассмотрим полученные спектры ПМР. При 30 °С в ПМР спектре раствора в D_2O йопромида стандартного образца (рис. 6) видны сигналы метильных групп только 2 *Z*-атропомеров при 2,96 и 3,02 м. д., т.е. для стандартного образца выполняется равенство $\Sigma E = 0$ %.

По виду аналогичных сигналов в ПМР спектрах раствора субстанции йопромида серии 1 при температурах 30, 50 и 70 °С было найдено, что скорость взаимопревращений образовавшихся уже при 50 °С *Z*-конформеров с ростом температуры увеличивалась: при 70 °С сигналы сливались (рис. 7, *a, б, в*). Кроме того, ПМР спектр раствора, выдержанного 30 мин при 70 °С и затем охлаждённого до 30 °С, вновь приобрёл исходный вид (рис. 7, *г*). При этом в области температур от 30 до 70 °С в ПМР спектрах (рис. 7, *a, б, в*) суммы площадей сигналов метильных групп *E*-атропомеров и *Z*-конформеров и относительные вклады в эти суммы *E*-атропомеров были постоянны и равны соответственно 3,85 и 22 %. Таким образом, в растворах при температурах ниже 70 °С конформеры *E1* и *Z1*, *E2* и *Z2* (в терминах [2]) по отношению друг к другу попарно атропомерны. Вид сигнала метильных групп *E*-атропомеров при 30 °С (~ 3,2 м. д.), взятого на рис. 7, *a* в овал, говорит о его суммарном характере, аналогичный характер имеют сигналы этих групп на рис. 7, *г* и 8, *б*. Это соответствует ВЭЖ-хроматограммам, полученным при 20 °С (рис. 3 и 4).

Однако при 50 и 70 °С *E*-атропомеры по отношению друг к другу становятся конформерами (рис. 7, *б* и 7, *в*), сохраняя атропомерность по отношению к *Z*-конформерам.

Приведенные данные говорят о том, что возможные конформеры йопромида (т.е. *E1*, *E2*, *Z1* и *Z2* в терминах [2]) в выбранных условиях ВЭЖХ, т.е. при 20 °С, ведут себя как атропомеры, что и позволяет определять долю каждого из них в конкретно взятых испытуемых растворах, методики приготовления которых жёстко регламентированы. В противном случае разум-

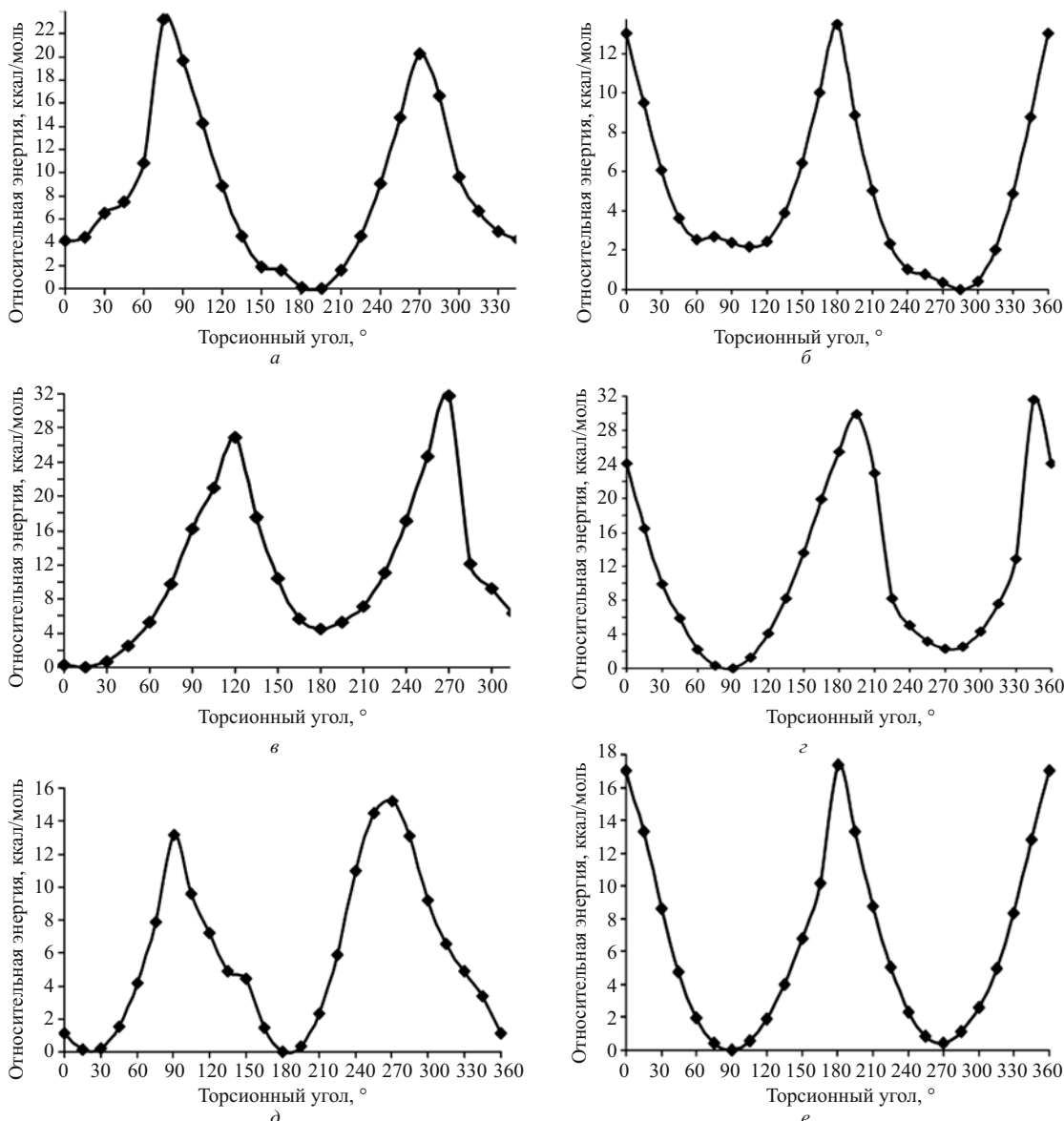


Рис. 10. Зависимости “конформационная энергия, ккал/моль, — торсионный угол, °” в изолированной молекуле йопромид для углов: а) C1-N1-C7A-C8A; б) C6-C1-N1-C7A; в) C3-C10-N2-C12; г) C2-C3-C10-N2; д) C5-C15-N3-C16A; е) C4-C5-C15-N3. Примечание. Минимальное расчётное значение ординаты на каждом графике принято равным нулю.

ная интерпретация результатов анализа окажется невозможной. Целесообразно относительные содержания атропомеров в лекарственных формах йопромид тем или иным способом стандартизовывать с целью проверки, достигнут ли равновесный состав в процессе производства. Именно такой состав обеспечивает фазовую устойчивость растворов йопромид в диапазоне температур от 0 до 120 °C в виду того, что *E*-атропомеры растворимы существенно лучше, нежели *Z*-атропомеры. При перекристаллизации йопромид первыми выпадают именно *Z* атропомеры. Необходимо отметить, что в стандартных условиях стерилизации растворов для парентерального введения (120 °C, 15 мин) де-факто достигается необходимый постоянный конформерный состав растворов йопромид, и именно он является равновесным. Конформеры, достигшие равновесия в растворе при 120 °C, в обычно используемых условиях хранения и применения ле-

карственных форм йопромид атропомерны. Для иллюстрации влияния условий стерилизации на равновесие между конформерами приводим ПМР спектры растворов субстанции йопромид серии 2 (рис. 8, а, б).

На рис. 8, б наблюдается суммарный сигнал метильных групп *E*-атропомеров, которые образовались в растворе субстанции йопромид серии 2 при 120 °C как *E*_{1,2}-конформеры, соответственно из *Z*_{1,2}-конформеров, сигналы метильных групп которых на рис. 8, а лежат при 2,94 ± 0,04 м.д. Очевидно, что приготовление лекарственных форм с использованием субстанций йопромид типа серии 2 на этапе растворения приведёт к получению растворов, не отвечающих требованиям монографии [2], ибо их ВЭЖ-хроматограммы будут соответствовать рис. 3, а при комнатной температуре они будут мутнеть. Только после термической стерилизации такие растворы станут соответствовать требованиям монографии [2] по про-

значности, а их ВЭЖ-хроматограммы приобретут вид, показанный на рис. 4, и для них станет выполняться упомянутое выше неравенство $\Sigma E \geq 20$ %.

Влияние состава среды растворения на скорости взаимопревращений конформеров иллюстрируют ПМР-спектры растворов субстанции йопромида серии 1, представленные на рис. 7, *a, б* и 9, *a, б*. Их сравнение показывает, что смена среды растворения йопромида с D₂O на 0,9 % раствор NaCl в D₂O резко увеличила скорости протекающих процессов — на рис. 9, *a, б* сигналы конформеров разделяются намного хуже, чем соответствующие им сигналы на рис. 7, *a, б*.

Весьма вероятно, что аналогичный эффект, обусловленный присутствием электролитов, будет наблюдаться и в водных (H₂O) растворах йопромида.

Конформационный анализ молекулы йопромида методом квантовой химии

Выше показано, что данные рентгенодифракционного исследования монокристалла йопромида позволяют рассматривать суперпозицию *R,R* и *R,S* диастереомеров как адекватную модель его конфигурации. Центросимметричность пространственной группы кристалла говорит о присутствии в нём также *S,S* и *S,R* энантиомеров. В растворах йопромида соотношения между этими соединениями постоянны и не зависят от температуры. Однако экспериментально на ВЭЖ-хроматограммах и в ПМР спектрах растворов йопромида диастереомеры и энантиомеры не дифференцируются. Это позволило с использованием методов ПМР и ВЭЖХ изучить конформерные равновесия, реализующиеся в растворах йопромида при повышенной температуре, и показать, что все конформеры, находившиеся в равновесии при 120 °С, при охлаждении растворов до 30 °С переходят в состояние атропомеров, концентрации которых равны ранее установившимся равновесным концентрациям соответствующих конформеров.

Для сравнительной оценки вероятности существования тех или иных конформерных структур йопромида было предпринято квантово-химическое исследование, объектом которого был выбран диастереомер *RR*. При рассмотрении полученных данных использовалась стереохимическая классификация конформеров. В молекуле йопромида имеется 6 связей, вокруг которых затруднено вращение (см. рис. 1, *б*): 3 амидных связи (C15–N3, C10–N2, N1–C7), вращение вокруг которых обуславливает возможность *E, Z* изомерии, и 3 связи заместителей с атомами углерода бензольного кольца (C1–N1, C3–C10, C5–C15). Барьеры вращения вокруг этих связей оценивали в рамках приближения M052X/6-311G(d, p) по программе GAMESS-US [9]. Сканирование торсионных углов C1–N1–C7A–C8A; C6–C1–N1–C7A; C3–C10–N2–C12; C2–C3–C10–N2; C5–C15–N3–C16A; C4–C5–C15–N3 проводили с шагом 15°. Полученные данные представлены графически на рис. 10. На графиках *a, в, д* абсциссы, равные 0°

и 180°, соответствуют *E* и *Z*-конфигурациям амидной группы; на графиках *б, з, е* абсциссы, равные 90° и 270°, соответственно отвечают 2 предельным положениям заместителей относительно плоскости бензольного кольца (угол, равный 90°, отвечает положению заместителей, показанному на рис. 1, *б*, а угол, равный 270°, — их альтернативным положениям).

В работе [10] показано, что атропомеры можно разделить, если барьер перехода между ними > 23 ккал/моль. Как видно из рис. 10, барьеры вращения заместителей при атомах C1 и C5 существенно ниже 23 ккал/моль и, по-видимому, соответствующие *E,Z*-конформеры и конформеры, существование которых обусловлено сменой ориентации этих заместителей относительно плоскости бензольного кольца, не могут быть обнаружены в растворах ни хроматографическими методами, ни методом ПМР из-за высокой скорости взаимных переходов.

Переходы, описываемые кривыми (рис. 10 *a, в, з*), требуют особого рассмотрения. Барьер вращения вокруг связи C3–C10 равен 29,9 ккал/моль, что заметно больше 23 ккал/моль, т.е. при комнатной температуре скорость соответствующего перехода близка к нулю.

Барьер перехода торсионного угла C1–N1–C7A–C8A от *Z* к *E*-конфигурации равен 20,3 ккал/моль, т.е. близок к 23 ккал/моль. Обратный переход от *E* к *Z*-конфигурации требует лишь 16 ккал/моль, поскольку *E*-конфигурация менее стабильна (на 4,3 ккал/моль). Такой переход должен происходить быстро и не фиксируется используемыми методами физико-химического анализа.

Наиболее интересным представляется вращение вокруг связи C10–N2 (рис. 10, *в*). Для перехода из *Z* в *E*-конфигурацию барьер равен 22,3 ккал/моль, т.е. близок к значению 23 ккал/моль. Для обратного перехода барьер равен 26,8 ккал/моль, поскольку *E*-конфигурация более стабильна, следовательно, такой переход маловероятен. Таким образом, сразу после растворения все вещество должно было бы приобрести *E*-конфигурацию, но это не согласуется с данными ВЭЖХ, ПМР, РСА. Это противоречие объясняется тем, что расчётные данные получены для изолированных *Z,E*-конформеров, а в этом случае в *E*-конфигурации существует относительно прочная внутримолекулярная водородная связь N3–H3A...O5A (N–H 1,01 Å, H...O 2,04 Å, N...O 3,028 Å, ∠NHO 164°), в то время как в *Z*-конфигурации прочные водородные связи отсутствуют. Энергия подобных водородных связей составляет ~ 4 ккал/моль. Очевидно, что в растворе молекулы йопромида сольватированы и образуют лишь межмолекулярные водородные связи с молекулами растворителя (воды). Таким образом, поскольку в растворе в молекулах *E*-конформера внутримолекулярные водородные связи отсутствуют, его энергия будет на ~ 4 ккал/моль выше расчетной, т.е. окажется соизмеримой с таковой у *Z*-конформера. Именно эти 2 конформера обнаруживаются методами ВЭЖХ и ПМР. В Фармакопее США [2] они характеризуются как Z1 и Z2, но, согласно полученным нами результатам, это *E_a*, *Z_a*-конформеры йопромида по амидной связи C10–N2

в заместителе при С3, находящемся по отношению к плоскости бензольного кольца в положении, показанном на рис. 1, б, что обозначено дескриптором “а”.

При нагревании раствора йопромида до 70 °С сигналы метильных групп на спектре ПМР сливаются, т.е. при этой температуре скорость преодоления барьера, равного ~ 22 – 23 ккал/моль, становится весьма высокой. При этом энергии, требуемой для поворота вокруг связи С3–С10, при 70 °С недостаточно. Однако при термической стерилизации, протекающей при 120 °С, барьер в 29,9 ккал/моль преодолевается, т.е. вращение вокруг связи С3–С10 оказывается возможным, и, помимо указанных выше E_a , Z_a -конформеров, образуются E_b , Z_b -конформеры по амидной связи С10–N2, но для заместителя при С3, находящемся по отношению к плоскости бензольного кольца в положении альтернативном, показанному на рис. 1, б (развернутым относительно связи С3–С10 на 180°), что обозначено дескриптором “б”. Таким образом, в растворе при 120 °С после выдержки, равной 15 мин, в динамическом равновесии существуют 4 конформера, образующие при 20 °С, уже будучи в состоянии атропомеров, соответствующие пики на ВЭЖ-хроматограмме охлаждённого раствора.

Тот факт, что после достижения равновесия и охлаждения доля в растворах E_b , Z_b -атропомеров, называемых в терминах [2] $E1$, $E2$, меньше, когда метилсодержащий заместитель при С3 находится в положении, альтернативном показанному на рис. 1, б, соответствует полученным нами расчетным данным (рис. 10, з). Минимум энергии при значении угла С2–С3–С10–N2, равном 90°, лежит ниже, чем при его значении, равном 270°, следовательно, доля E_b , Z_b -атропомеров в этом случае должна быть меньше.

Здесь следует обратить внимание на один важный фактор, который пока не обсуждался. При проведении конформационного анализа барьеры вращения заместителей рассматривались в предположении, что эти вращения независимы. Этого вполне достаточно для оценки энергии барьеров вращения. Однако учет взаимных влияний углов поворота заместителей потребовал бы специального рассмотрения, выходящего за рамки настоящей работы. Предположение о взаимной независимости вращения заместителей с учётом того факта, что кристаллическая структура йопромида центросимметрична, приводит к признанию необходимости существования на ВЭЖ-хроматограммах растворов кристаллов, как минимум 2 пиков конформеров (например $Z2$, $E1$ или $Z2$, $E2$ в терминах [2]), но этого не наблюдается. Следовательно, вращение заместителей приходится рассматривать как взаимозависимые процессы. Возможность такого подхода показана в работе [11].

Исходя из совокупности полученных данных атропомеры, обозначаемые согласно [2] как $Z1$, $Z2$, $E1$, $E2$, по стереохимической классификации являются:

$Z1$ и $Z2$ — E_a и Z_a -атропомерами по связи С10–N2 в заместителе при С3, находящемся в положении, показанном на рис. 1, б;

$E1$ и $E2$ — E_b и Z_b -атропомерами по связи С10–N2 в заместителе при С3, находящимся в положении, альтернативном положению, показанному на рис. 1, б (к сожалению, точное соответствие атропомеров $E1$, $E2 \leftrightarrow E_b$, Z_b не может быть установлено существующими методами).

Рассмотрение в совокупности приведенных выше экспериментальных данных позволяет считать следующее.

1) Применительно к фармакопейной оценке качества субстанций йопромида нет смысла нормировать, как это сделано в [2], какую-либо из сумм содержаний атропомеров — $Z1 + E1$ (в пределах от 40 до 51 %) или $Z2 + E2$ (в пределах от 49 до 60 %), поскольку эти величины не несут определяющей качество информации. При контроле качества субстанций йопромида имеет смысл проверять способность их водных растворов в процессе термической обработки (120 °С; 15 мин) образовывать $E1$ и $E2$ -конформеры (E_b и Z_b в стереохимической классификации) в количествах, удовлетворяющих неравенству $\Sigma E \geq 20\%$ [иначе $(E_b + Z_b) \geq 20\%$], без образования в недопустимых количествах примесей, а также йодид-ионов. (В неравенствах буквенными символами обозначены содержания атропомеров в % по отношению к суммарному содержанию йопромида в испытуемых растворах.) Эта проверка может проводиться методом ТСХ одновременно с определением подлинности испытуемой субстанции и содержания в ней примесей. Нет препятствий к получению лекарственных форм из выдержавших эту проверку субстанций йопромида, поскольку конформерный состав последних, быстро достигающийся в процессе термической стерилизации, является равновесным. Естественно, что аналогичную проверку необходимо проводить и при контроле качества термически стерилизованных готовых лекарственных форм йопромида. Выполнение неравенства $(E_b + Z_b) \geq 20\%$ гарантирует их агрегативную устойчивость и подтверждает их подлинность.

2) Не подлежит сомнению, что с целью контроля качества недопустимо определять содержание йопромида, как в субстанции, так и в лекарственных формах, методом ВЭЖХ по стандарту. Практически все йодсодержащие рентгеноконтрастные средства количественно определяют путём восстановления органически связанного йода с последующим титрованием образовавшихся йодид-ионов по Фаянсу 0,05 М или 0,1 М раствором азотнокислого серебра [12, 13]. Для количественного определения йопромида особенно важно применять именно йодометрический метод, т.к. на ВЭЖ-хроматограммах стандартного образца (рис. 2) и объектов анализа (рис. 4) имеются, как правило, не одинаковые количества пиков атропомеров йопромида, площадь которых на каждой из хроматограмм приходится определять по отдельности и суммировать перед расчётом содержания определяемого йопромида, как суммарного содержания всех атропомеров. Понятно, что доверительный интервал полученного результа-

та по своим метрологическим характеристикам вряд ли может удовлетворять фармакопейным требованиям.

3) Для экспрессного определения содержания йопромида в лекарственных формах, например, при поэтапном контроле в условиях производства, целесообразно использовать прямой спектрофотометрический метод, не требующий наличия стандарта, поскольку удельный показатель поглощения йопромида ($A_{1\text{см}}^{1\%}$) в максимуме поглощения при 242 нм не зависит от атропомерного состава аналита. Подтверждением этого факта служит то, что при использовании УФ детектора ВЭЖ-хроматограммы, представленные на рис. 2 и 3, характеризуются одинаковым количеством йопромида ($\sim 7,20 \cdot 10^{-7}$ мкг), приходящимся на единицу суммарной площади пиков атропомеров, несмотря на абсолютно разный атропомерный состав хроматографированных образцов аналита. При этом в водном растворе величина $A_{1\text{см}}^{1\%}$ йопромида, равная 394, обеспечивает доверительный интервал результата спектрофотометрического определения его содержания, не превышающий 3 отн. % при степени надёжности равной 0,05.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Москва (2005), сс. 1018, 1019.
2. U. S. Pharmacopeia, USP35-NF30 S2, Monographs: Iopromide, Iopromide Injection (2012).
3. M. Oki, *Topics Stereochem.*, **14**, 1 – 81 (1983).
4. В. М. Потапов, *Стереохимия*, Химия. Москва (1976), с. 18.
5. APEX2 and SAINT, *Bruker AXS Inc.*, Madison, Wisconsin, USA (2009).
6. SADABS, *Bruker AXS Inc.*, Madison, Wisconsin, USA (2008).
7. F. H. Allen, *Acta Crystallogr.*, (2002), B58, 380; Cambridge Structural Database, (2011), Version 5,33.
8. G. M. Sheldrick, *Acta Cryst.*, A64, 112 (2008).
9. M. W. Schmidt, K. K. Baldrige, J. A. Boatz, et al., *J. Comput. Chem.*, **14**, 1347 – 1363 (1993).
10. H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **9**, 219 (1970).
11. P. M. Henrichs, K. Estep, L. L. Musza, C. A. Rodger, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 2058 – 2066 (1995).
12. И. П. Косенко, Т. Н. Боковикова, М. С. Гойзман и др., А.С. СССР № 1029732 (1983).
13. U. S. Pharmacopeia, USP35-NF30 S2, Monographs: Iohexol, Iohexol Injection (2012).

Поступила 09.12.13

ATROPOMERIC COMPOSITION OF IOPROMIDE: CRITERION FOR EVALUATING THE QUALITY OF PARENT COMPOUND AND RELATED DRUGS

R. G. Glushkov¹, M. S. Goizman^{2*}, D. A. Arantseva², N. N. Demidova², E. K. Kulaeva², M. B. Zagudailova², D. W. Dmitriev³, A. S. Trifilenkov³, A. A. Korlyukov⁴, D. E. Arkhipov⁴, K. Yu. Suponitskii⁴, N. L. Shimanovskii⁵, E. V. Zaitsev⁶, and E. V. Degterev^{7*}

¹ Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 109240 Russia.

² Drug Technology Co., Khimki, Moscow oblast, 141400 Russia.

³ Chemical Diversity Research Institute, Khimki, Moscow oblast, 141401 Russia.

⁴ Nesmeyanov Institute of Organoelemental Compounds, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia.

⁵ Pirogov State Medical University, Moscow, 117997 Russia.

⁶ INFARMA Company, Tomsk, 834021 Russia.

⁷ Folium Publishing, Moscow, 127411 Russia.

* e-mail: chem@folium.ru

The atropomeric composition of iopromide and its injection dosage forms is considered. It is shown that, in aqueous solutions of iopromide at 120°C, its atropomers transform into the state of conformers. At this temperature, an equilibrium concentration of conformers is reached in 15 min. Therefore, atropomeric composition of iopromide substance, from which solutions are obtained according to described technology, cannot prevent the attainment of conformational equilibrium at 120°C. The equilibrium composition of solutions remains constant upon cooling (when conformers transform into the state of atropomers). It is shown that for practical usage, the most important criterion of the quality of iopromide preparations is the total relative content (ΣE) of atropomers *E1* and *E2* (in terms of USP). Only the condition $\Sigma E > 20\%$ guarantees phase stability of iopromide solutions with concentrations ≤ 769 mg/mL in a wide temperature range (0 to 120°C). The inequality $\Sigma E \geq 20\%$ is achieved when iopromide preparations undergo thermal sterilization.

Keywords: iopromide; conformer; atropomer; thin layer chromatography (TLC); high performance liquid chromatography (HPLC); proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR); x-ray diffraction; quantum chemistry; conformation analysis