

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2014

А. А. Илларионов, Л. Н. Грушевская, Л. М. Гаева, М. Е. Дуденкова,
Н. И. Авдюнина, Б. М. Пятин, К. В. Алексеев, Е. В. Блынская, И. В. Богунова

РАЗРАБОТКА МЕТОДИК АНАЛИЗА ТАБЛЕТОК НОВОГО ВЕЩЕСТВА С КАППА-ОПИОИДНОЙ АГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ РУ 1205

ФГБУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова” РАМН, Москва, Россия

Разработана методика фармацевтического анализа таблеток нового каппа-опиоидного агониста, производного имидазобензимидазола, РУ 1205. Изучены основные фармакопейные показатели качества таблеток, проведена оценка содержания посторонних примесей и количественное определение РУ 1205 в таблетках методом ВЭЖХ. Разработана методика определения однородности дозирования с помощью УФ-спектрофотометрии, предложены методики определения подлинности и показателя “Растворение” таблеток РУ 1205.

Ключевые слова: РУ 1205; таблетки; фармацевтический анализ; методика анализа; высокоэффективная жидкостная хроматография; ВЭЖХ; УФ-спектрофотометрия; посторонние примеси; количественное определение; однородность дозирования; тест “Растворение”.

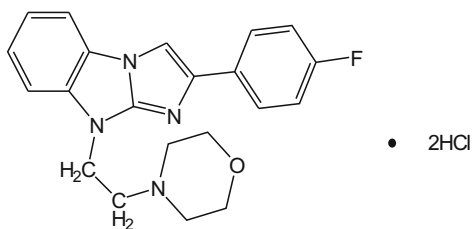
РУ-1205 (I) — новое соединение ряда 2,9-дизамещенных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, проявляющее каппа-опиоидную агонистическую активность [1].

По химической структуре I представляет собой дигидрохлорид 2-(4-фторфенил)-9-морфолиноэтилимидазо[1,2-*a*]бензимидазола (рис. 1).

Фармакологическое изучение показало высокую эффективность I при большой широте терапевтического действия [1], что свидетельствует о перспективности его фармацевтической разработки.

В опытно-технологическом отделе ФГБУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова” РАМН была разработана твердая дозированная лекарственная форма I — таблетки, покрытые оболочкой (заявка на выдачу патента № 2013144038).

Целью настоящего исследования являлась разработка методик анализа лекарственной формы I и определение основных фармакопейных показателей ее качества.



$C_{21}H_{23}Cl_2FN_4O$ Молек. масса 437,34

Рис. 1. Структурная формула I.

Экспериментальная часть

Исследования проведены на серийных образцах таблеток I 10 мг, покрытых оболочкой, разработанных в лаборатории готовых лекарственных форм опытно-технологического отдела ФГБУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова” РАМН.

При проведении исследований использованы серийные образцы субстанции I, синтезированные в ЗАО “ЭМПИЛС-ФОХ” (Ростов-на-Дону, Россия) и очищенные путем кристаллизации в опытно-технологическом отделе ФГБУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова” РАМН, а также промежуточные продукты синтеза субстанции I: 2-аминобензимидазол (II), 2-амино-1-морфолиноэтилбензимидазол (III) и бромид 2-амино-1-морфолиноэтил-3-(4-фторфенил)бензимидазолия (IV). Свидетели технологических примесей II и III получены в группе технологии синтеза лекарственных средств опытно-технологического отдела ФГБУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова” РАМН, свидетель примеси IV предоставлен ЗАО “ЭМПИЛС-ФОХ” (Ростов-на-Дону, Россия).

Хроматографический анализ таблеток I проведен с помощью метода ВЭЖХ на хроматографе Golden System (Beckman Coulter, Inc, США) с градиентным насосом (модель 127) и спектрофотометрическим детектором с переменной длиной волны (модель 166), программное обеспечение — пакет “Мультихром 1.5” (ЗАО Амперсенд, Россия).

Исследования спектральных характеристик препарата в УФ-области спектра проведены на спектрофотометре UV-1700 (“Shimadzu”, Япония).

Результаты и их обсуждение

По внешнему виду таблетки I — круглые двояковыпуклые, покрытые оболочкой почти белого цвета.

Теоретическая средняя масса таблетки I по прописи — 0,210 мг. Определенная экспериментально средняя масса таблеток составляла от 0,194 до 0,226 г, отклонения от средней массы не превышали 7,5 %, время распадаемости составляло не более 30 мин.

Определение подлинности таблеток I мы предложили проводить по совпадению максимумов поглощения УФ-спектров извлечения испытуемого препарата и раствора рабочего стандартного образца (PCO) I в области от 200 до 350 нм, а также с помощью метода ВЭЖХ по совпадению времен удерживания испытуемого раствора и раствора PCO I.

Для определения подлинности методом УФ-спектроскопии готовили извлечение из таблеток в смеси спирт этиловый 95 % — вода очищенная (1:1) с концентрацией I — 0,01 мг/мл. Извлечение фильтровали через фильтр “Миллипор” с диаметром пор 0,45 мкм.

Полученные растворы в области от 200 до 350 нм имели 2 максимума при (272 ± 2) нм и (242 ± 2) нм и 2 минимума при (255 ± 2) нм и (225 ± 2) нм (рис. 2). Положения максимумов и минимумов испытуемого раствора I и раствора PCO I полностью совпадали (рис. 2, а и б). Извлечение из плацебо в области указанных максимумов растворов I электромагнитное излучение не поглощало (рис. 2, в).

Идентификацию I в таблетках методом ВЭЖХ проводили одновременно с количественным определением по соответствию времени удерживания пика I на хроматограмме испытуемого раствора и времени удерживания пика I на хроматограмме раствора PCO.

Определение посторонних примесей в таблетках I проводили методом ВЭЖХ в условиях, разработанных ранее для анализа субстанции I [2], стальная колонка длиной 150 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная сорбентом Hypersil BDS C18 с размером частиц 5 мкм ($150 \times 4,6$ мм BDS Hypersil C18, 5 мкм (Thermo scientific)), скорость потока подвижной фазы — 1,0 мл/мин, температура колонки — комнатная, режим элюирования изократический, объем пробы — 20 мкл.

Таблица 1
Результаты определения поправочных коэффициентов для технологических примесей I

Наименование соединения	Поправочные коэффициенты (усредненные по 5 хроматограммам)			Среднее значение коэффициента
	Концентрация, мг/мл			
	0,002	0,005	0,01	
Примесь II	1,39	1,38	1,41	1,39
Примесь III	2,90	2,92	2,98	2,93
Примесь IV	3,12	3,06	2,95	3,04

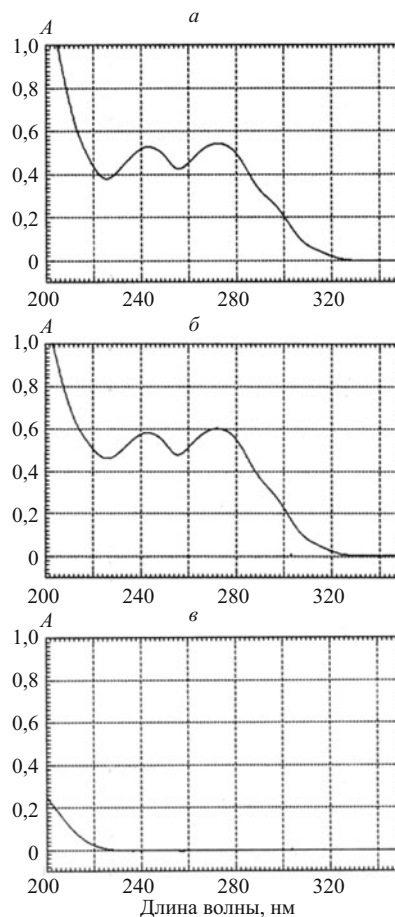


Рис. 2. УФ-спектры извлечения из таблеток I (а), раствора PCO I (б) и извлечения из плацебо (в) в смеси спирт этиловый 95 % — вода очищенная (1:1).

Подвижная фаза представляла собой смесь 100 мл ацетонитрила для градиентной ВЭЖХ, 100 мл метанола для ВЭЖХ и 150 мл раствора 3,48 г калия фосфорнокислого двузамещенного трехводного в 1000 мл воды для градиентной ВЭЖХ. pH раствора калия фосфорнокислого двузамещенного доводили до $7,40 \pm 0,5$ кислотой фосфорной концентрированной. Получен-

Таблица 2
Результаты определения содержания технологических примесей в модельных смесях плацебо, I и примесей

№ п/п	Заданная концентрация примеси, мг/мл	Обнаружено примеси		Относительная ошибка, %
		мг/мл	в % от заданной концентрации	
Примесь 1				
1	0,00101	0,00116	114,85	14,85
2	0,00202	0,00214	105,94	5,94
3	0,00505	0,00495	98,02	1,98
Примесь 2				
1	0,00102	0,00111	108,82	8,82
2	0,00204	0,00208	101,96	1,96
3	0,00510	0,00495	97,06	2,94
Примесь 3				
1	0,00105	0,00097	92,38	7,62
2	0,00209	0,00204	97,60	2,40
3	0,00523	0,00503	96,18	3,82

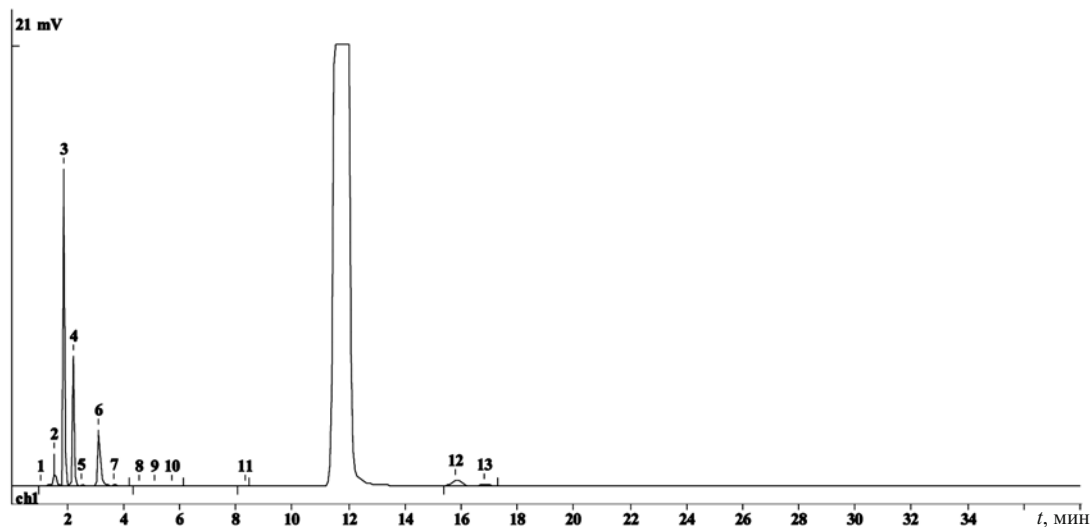


Рис. 3. Хроматограмма модельной смеси извлечения из таблеток РУ 1205 и технологических примесей РУ 1205 (концентрация I — 1 мг/мл, концентрация примесей — 0,01 мг/мл): 1 и 2 — пики плацебо; 3 — примесь II; 4 — примесь III; 6 — примесь IV.

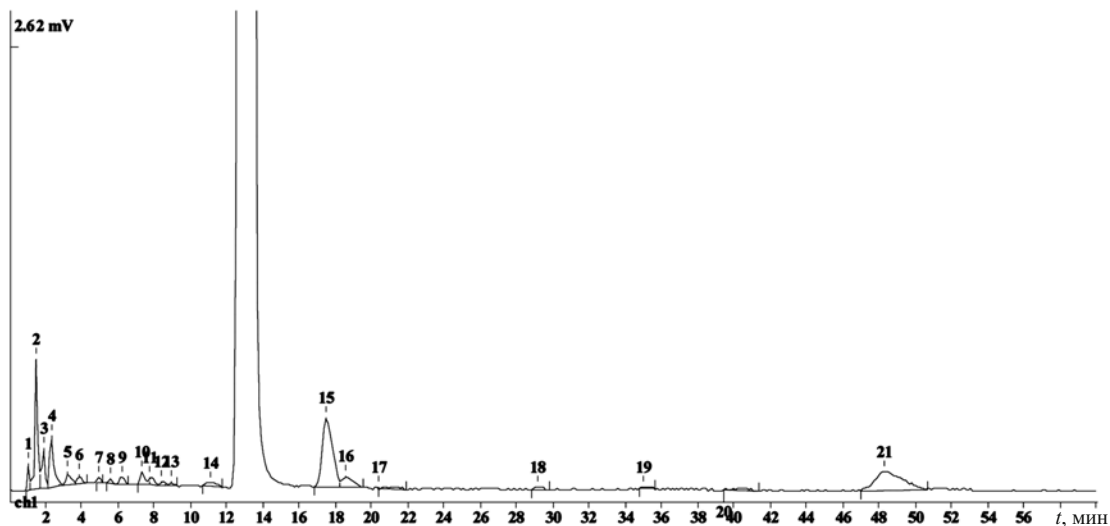


Рис. 4. Типичная хроматограмма извлечения из таблеток I, покрытых оболочкой.

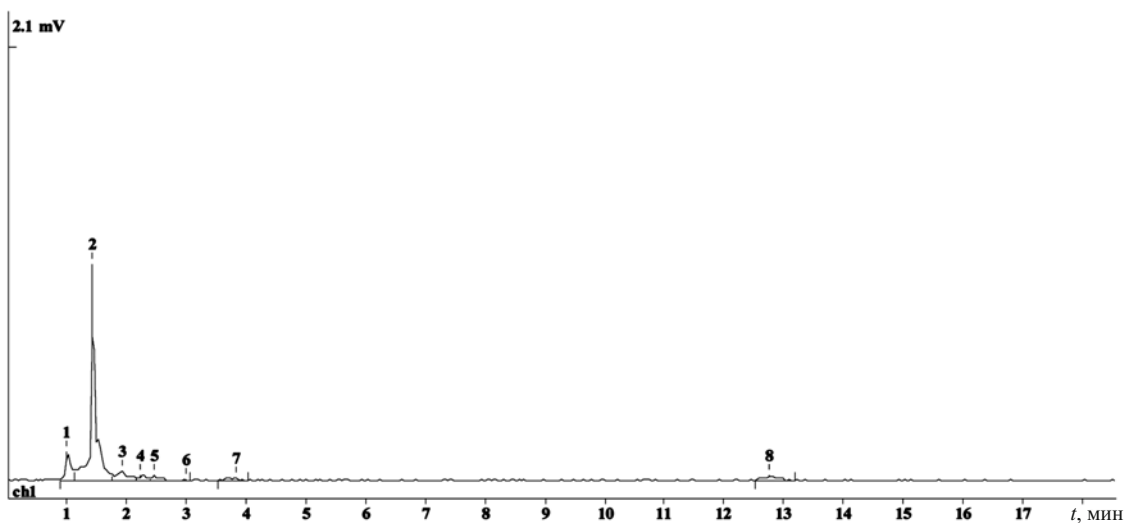


Рис. 5. Хроматограмма извлечения из плацебо.

ную смесь фильтровали через фильтр “Миллипор” с диаметром пор 0,22 мкм и дегазировали.

Действующее вещество и примеси из таблеток извлекали смесью метанола для ВЭЖХ и воды для градиентной ВЭЖХ (1:1).

Аналитическая длина волны, 275 нм, была выбрана на основании анализа УФ-спектров растворов I и технологических примесей.

В указанных условиях происходит полное разделение I и технологических примесей (рис. 3).

Извлечение из плацебо, приготовленное аналогично испытываемому раствору, определению посторонних примесей в таблетках I не мешает.

Линейная зависимость площади пика от концентрации I подтверждена в пределах интервала от 0,001 до 0,05 мг/мл, примеси II — от 0,0001 до 0,01, примеси III — от 0,0001 до 0,04 мг/мл, примеси IV — от 0,0002 до 0,05 мг/мл, коэффициенты корреляции не менее 0,999.

Предел обнаружения I составил около 0,0008 мкг (0,00004 мг/мл), примеси II — около 0,0012 мкг (20 мкл раствора с концентрацией 0,00006 мг/мл), примеси III — около 0,0016 мкг (20 мкл раствора с концентрацией 0,00008 мг/мл), примеси IV — около 0,002 мкг (20 мкл раствора с концентрацией 0,0001 мг/мл).

Приготовление испытываемых растворов проводили следующим образом: около 0,210 г (точная навеска) массы растертых таблеток I переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляли около 8 мл смеси метанол для ВЭЖХ — вода для градиентной ВЭЖХ (1:1) и помещали на ультразвуковую баню на 15 мин. Затем содержимое колбы доводили до метки тем же растворителем, перемешивали и фильтровали через фильтр “Миллипор” с диаметром пор 0,45 мкм (испытываемый раствор, концентрация I — 1 мг/мл).

В качестве раствора РСО использовали раствор I в смеси метанол для ВЭЖХ — вода для градиентной ВЭЖХ (1:1) с концентрацией I 0,01 мг/мл.

Содержание единичной примеси в процентах (X , %) рассчитывали по следующей формуле:

$$X = \frac{S_{\text{пр}} \cdot m_{\text{ст}} \cdot m_{\text{ср}} \cdot (W - Z_{\text{ст}}) \cdot 10}{S_{\text{ст}} \cdot m_{\text{нав}} \cdot C \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100} \cdot 100\% = \frac{S_{\text{пр}} \cdot m_{\text{ст}} \cdot m_{\text{ср}} \cdot (W - Z_{\text{ст}})}{S_{\text{ст}} \cdot m_{\text{исп}} \cdot C \cdot 25 \cdot 10}$$

где $S_{\text{пр}}$ — площадь пика индивидуальной примеси, $S_{\text{ст}}$ — площадь пика I на хроматограмме раствора РСО, $m_{\text{ст}}$ — масса навески РСО I, г, $m_{\text{нав}}$ — масса навески таблеток I, г, $m_{\text{ср}}$ — средняя масса таблетки I, г, C — содержание I в одной таблетке, г, W — количественное содержание I в РСО, %, $Z_{\text{ст}}$ — потеря в массе РСО I, %.

Для проверки пригодности хроматографической системы готовили раствор РСО I и примеси IV в подвижной фазе с концентрацией каждого соединения 0,01 мг/мл и использовали следующие критерии: относительное стандартное отклонение результатов от-

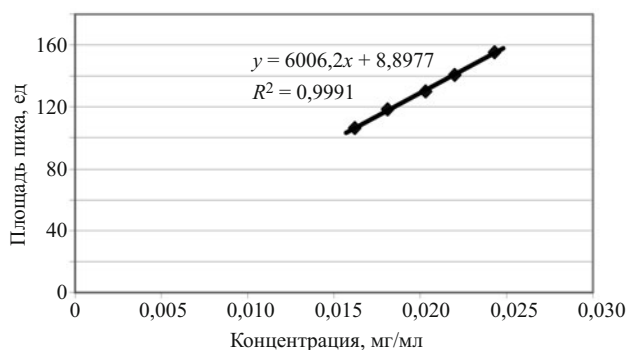


Рис. 6. Зависимость площади пика от концентрации модельных смесей I и плацебо.

дельных измерений площадей пиков I — не более 2 %, число теоретических тарелок — не менее 4500, коэффициент асимметрии пика I — не более 1,5, и относительное время удерживания примеси IV (относительное времени удерживания I) в растворе для проверки пригодности хроматографической системы должно составлять $0,25 \pm 0,03$.

Типичная хроматограмма испытываемого извлечения из таблеток I, покрытых оболочкой, приготовленного по методике проекта ФСП, представлена на рис. 4.

Хроматограмма извлечения из плацебо, приготовленного аналогично извлечению из таблеток I, представлена на рис. 5.

Как видно из рис. 4 и 5, некоторые компоненты плацебо, время удерживания которых близко ко времени удерживания примеси II, могут мешать количественному определению примеси II.

Для того чтобы оценить степень влияния пиков плацебо на результаты определения содержания примеси II, нами был проведен анализ модельных смесей плацебо и I в соотношении, идентичном их соотношению в таблетках (концентрация I — 1 мг/мл) с добавлением технологических примесей в содержании 0,1, 0,2 и 0,5 % от содержания I (концентрации 0,001, 0,002, 0,005 мг/мл).

Количественное определение примесей в извлечениях из модельных смесей проведено с применением поправочных коэффициентов, рассчитанных для модельных смесей I и технологических примесей 3 концентраций (0,01, 0,005 и 0,002 мг/мл) по формуле:

$$K_x = \frac{S_{\text{ст}} \cdot C_x}{S_x \cdot C_{\text{ст}}}$$

где C_x , $C_{\text{ст}}$ — концентрации примеси и стандарта (I), в мг/мл; S_x , $S_{\text{ст}}$ — площади пиков примеси и стандарта (I) в единицах интегратора.

Результаты определения поправочных коэффициентов представлены в табл. 1.

Результаты количественного определения примесей в модельных смесях представлены в табл. 2.

Как видно из таблицы, при содержании примесей в растворах около 0,2 % от концентрации I, относительная ошибка определения для всех примесей не превы-

шает 6 %, а при содержании примесей 0,5 % — относительная ошибка не превышает 4 %.

В табл. 3 представлены результаты определения посторонних примесей в образцах таблеток I. Содержание единичной примеси во всех образцах не превышало 0,3 %, а сумма примесей — 0,9 %.

Количественное определение I в таблетках, покрытых оболочкой, проводили методом ВЭЖХ в условиях определения посторонних примесей, извлечение I из таблеток и определение пригодности хроматографической системы проводили так же, как и при определении посторонних примесей. Вспомогательные вещества проведению анализа не мешали.

Концентрация испытуемого раствора и раствора РСО I составляла 0,02 мг/мл.

Линейную зависимость площади пика растворов I от их концентрации подтвердили на модельных сме-

сях I и плацебо в диапазоне концентраций от 0,016 до 0,024 мг/мл (рис. 6).

На модельных смесях I и плацебо с концентрацией I от 0,016 до 0,024 мг/мл показано, что относительная ошибка однократного определения не превышает 2 % (табл. 4).

Результаты количественного определения серийных образцов таблеток I соответствовали требованиям Государственной фармакопеи СССР XI издания [3].

Однородность дозирования таблеток I определяли с помощью метода УФ-спектрофотометрии. I извлекали из таблеток смесью спирт этиловый 95 % — вода (1:1), оптическую плотность извлечений измеряли при 272 нм. Компоненты плацебо проведению анализа не мешали (см. рис. 2).

Линейная зависимость оптической плотности от концентрации I в смеси спирт этиловый 95 % — вода

Таблица 3

Результаты определения посторонних примесей в таблетках РУ 1205

Номер серии	Относительные времена удерживания примесей и их содержание, %																Σ, %	
	0,15 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,29 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,43 ± 0,02	0,46 ± 0,03	0,56 ± 0,01	0,60 ± 0,02	0,64 ± 0,02	0,68 ± 0,02	0,83 ± 0,02	1,34 ± 0,03	1,40 ± 0,05	3,61 ± 0,08		
020213	0,04	0,06	-	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,24	0,04	0,18	0,68
030213	0,05	0,07	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01	0,02	0,03	0,02	0,01	0,01	0,03	0,23	0,04	0,22	0,80	
040213	0,04	0,07	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,23	0,04	0,22	0,74	
050213	0,05	0,08	0,03	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,03	0,01	0,01	0,01	0,04	0,23	0,04	0,21	0,81	
060213	0,04	0,06	-	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,23	0,03	0,17	0,66	

Таблица 4

Результаты количественного определения I в модельных смесях методом ВЭЖХ

Взято РУ 1205, мг/мл (m_1)	Найдено РУ 1205, мг/мл (m_2)	Найдено РУ 1205, % ($X = m_2 \cdot 100/m_1$)	Абсолютная ошибка, мг/мл ($d = m_2 - m_1$)	Относительная ошибка, % ($Y = d \cdot 100/m_1$)	Метрологические характеристики ($P = 95 \%, n = 5$)
0,0162	0,0164	101,23	+ 0,0002	1,23	$X_{cp} = 99,56 \%$ $S = 1,26$ $S_{x_{cp}} = 0,56$ $\Delta X = 1,57$ $\varepsilon = 1,58 \%$
0,0181	0,0182	100,55	+ 0,0001	0,55	
0,0203	0,0201	99,01	- 0,0002	0,99	
0,0220	0,0217	98,64	- 0,0003	1,36	
0,0243	0,0239	98,35	- 0,0004	1,65	

Таблица 5

Результаты количественного определения I в модельных смесях методом УФ-спектрофотометрии в смеси спирт этиловый 95 % — вода очищенная (1:1)

Взято РУ 1205, мг/мл (m_1)	Найдено РУ 1205, мг/мл (m_2)	Найдено РУ 1205, % ($X = m_2 \cdot 100/m_1$)	Абсолютная ошибка, мг/мл ($d = m_2 - m_1$)	Относительная ошибка, % ($Y = d \cdot 100/m_1$)	Метрологические характеристики ($P = 95 \%, n = 9$)
0,0070	0,0071	101,43	+ 0,0001	1,43	$X_{cp} = 101,12 \%$ $S = 0,74$ $S_{x_{cp}} = 0,25$ $\Delta X = 0,59$ $\varepsilon = 0,58 \%$
0,0078	0,0078	100,00	0	0	
0,0085	0,0086	101,18	+ 0,0001	1,18	
0,0092	0,0094	102,17	+ 0,0002	2,17	
0,0100	0,0101	101,00	+ 0,0001	1,00	
0,0107	0,0108	100,93	+ 0,0001	0,93	
0,0115	0,0117	101,74	+ 0,0002	1,74	
0,0122	0,0124	101,64	+ 0,0002	1,64	
0,0130	0,0130	100,00	0	0	

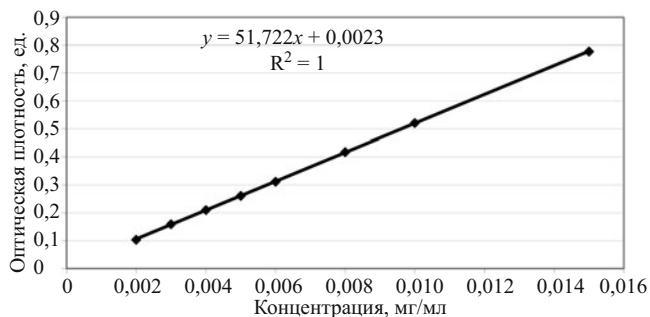


Рис. 7. Зависимость оптической плотности от концентрации растворов I в смеси спирт этиловый 95 % — вода очищенная (1:1).

очищенная (1:1) наблюдалась в интервале от 0,002 до 0,015 мг/мл (рис. 7).

На модельных смесях I и плацебо с концентрацией I от 0,007 до 0,0130 мг/мл показано, что относительная ошибка однократного определения не превышает 2,5 % (табл. 5).

Однородность дозирования серийных образцов таблеток I соответствовала требованиям Государственной фармакопеи, отклонения не превышали $\pm 5,5$ %.

Оценку степени высвобождения I из таблеток при определении показателя “Растворение” проводили в соответствии с требованиями ОФС 42-0003-04 “Растворение”: прибор типа “лопастная мешалка”, среда растворения — 900 мл 0,1 М раствора кислоты хлористоводородной, температура среды растворения — $37 \pm 0,5$ °С, скорость вращения — 50 об/мин, время анализа — 30 мин. Метод количественного определения — УФ-спектрофотометрия. Аналитическая длина волны, 260 нм, соответствовала положению максимума I в среде 0,1 М хлористоводородной кислоты.

Линейную зависимость оптической плотности от концентрации I подтверждали на модельных смесях I и плацебо (извлечения в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты) в интервале от 0,008 до 0,012 мг/мл: зависимость описывали уравнением $y = 56,658x + 0,0076$, коэффициент корреляции $r = 0,9999$.

Зависимость степени высвобождения I из таблеток от времени анализа представлена на рис. 8.

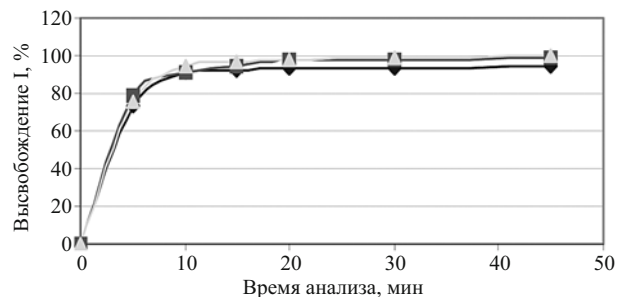


Рис. 8. Зависимость степени высвобождения I из таблеток, покрытых оболочкой, от времени анализа.

Анализ серийных образцов таблеток I показал, что для всех образцов уже через 30 мин степень высвобождения I составляла от 92 до 98 %.

Таким образом, нами определены основные фармакопейные показатели качества таблеток I 10 мг, покрытых оболочкой, разработаны методики определения посторонних примесей и количественного определения I в таблетках с помощью ВЭЖХ, определения однородности дозирования с помощью УФ-спектрофотометрии.

Предложен комплекс методик для идентификации таблеток I. Проведен анализ качества препарата по показателям “Посторонние примеси”, “Однородность дозирования”, “Количественное определение”.

Разработана методика определения показателя “Растворение” таблеток I, покрытых оболочкой. Показано, что уже через 30 мин в среду растворения высвобождается более 90% действующего вещества.

Разработанные методики будут включены в проект фармакопейной статьи предприятия на препарат.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. А. Спасов, В. А. Анисимова, П. М. Васильев и др., *Средство, обладающее каппа-опиоидной агонистической активностью*, Патент РФ 2413512, *Бюл. изобрет.*, № 7 (2011).
2. А. А. Илларионов, Л. Н. Грушевская, Л. М. Гаевая. *Хим.-фарм. журн.* **48**(5), 50 – 56 (2014).
3. *Государственная Фармакопея СССР. XI изд.*, Медицина, Москва (1990), с. 154.

Поступила 05.03.14

DEVELOPING METHODS FOR THE PHARMACEUTICAL ANALYSIS OF THE NEW KAPPA OPIOID AGONIST RU 1205 IN TABLETS

A. A. Illarionov, L. N. Grushevskaya, L. M. Gaevaya, M. E. Dudenkova, N. I. Avdyunina, B. M. Pyatin, K. V. Alekseev, E. V. Blinskaya, and I. V. Bogunova

Zakusov State Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 125315 Russia

A standard procedure of pharmaceutical analysis has been developed for the novel kappa opioid agonist, imidazobenzimidazole derivative RU 1205 in tablets. The main quality characteristics of tablets have been studied, the content of impurities is estimated, and the quantitative content of RU 1205 is determined by the method of high-performance liquid chromatography (HPLC). A UV spectrophotometric technique for determination of the uniformity of dosage is proposed and the drug identity and dissolution tests for the RU 1205 tablets are elaborated.

Keywords: RU 1205, tablets, pharmaceutical analysis, analytical techniques, high-performance liquid chromatography (HPLC), UV spectrophotometry, impurities, assay, uniformity of dosage, dissolution test