

# Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2010

М. С. Сергеева, Л. Н. Грушевская, Б. М. Пятин, К. В. Алексеев,  
Н. И. Авдюнина, Е. В. Блынская.

## РАЗРАБОТКА МЕТОДИК АНАЛИЗА ТВЕРДОЙ ДОЗИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ (КАПСУЛ) КАРДИОЦИКЛИДА

НИИ Фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, Россия; sergeeva\_m\_s@inbox.ru

Целью настоящих исследований являлась разработка методик фармацевтического анализа твердой дозированной лекарственной формы — капсул кардиоциклида, нового отечественного антиаритмического препарата III класса. Изучены основные фармакопейные показатели качества капсул кардиоциклида, определено содержание посторонних примесей методом ТСХ. Разработана методика ВЭЖХ в градиентном режиме, позволяющая в одних условиях проводить определение подлинности, чистоты и количественного содержания кардиоциклида в препарате. Разработаны методики определения подлинности, количественного определения, а также теста “Растворение” с помощью УФ-спектрофотометрии.

**Ключевые слова:** кардиоциклид, капсулы, ТСХ, ВЭЖХ, УФ-спектрофотометрия.

В рамках научных исследований по поиску и разработке новых кардиотропных средств в НИИ фармакологии имени В. В. Закусова РАМН был создан оригинальный антиаритмический препарат третьего класса — кардиоциклид (I). По химической структуре I представляет собой гидрохлорид N,N-дициклогексиламида N<sup>1</sup>-(3-диэтиламинопропил)-N<sup>1</sup>-(*para*-нитробензоил)-аминоуксусной кислоты [1].

Фармакологические исследования нового соединения показали необходимость создания твердой дозированной лекарственной формы I, на этом основании в НИИ фармакологии разработана лекарственная форма, представляющая собой капсулы I с содержанием фармакологически активного вещества 100 мг.

Целью настоящего исследования являлась разработка методик фармацевтического анализа капсул I.

### Экспериментальная часть

Исследования были проведены на серийных образцах капсул I.

В качестве объектов исследования при разработке методик анализа также использовали образцы субстанции I различных серий, промежуточные продукты 2 последних стадий синтеза I — N,N-дициклогексил-амид хлоруксусной кислоты (II) и N,N-дициклогексил-амид N<sup>1</sup>-(3-диэтиламинопропил)аминоуксусной кислоты (III), а также *para*-нитробензойную кислоту (IV), как наиболее вероятный продукт разложения I.

В процессе исследований использовали методы УФ-спектрофотометрии, тонкослойной хроматографии (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Анализ качества капсул I методом УФ-спектрофотометрии был выполнен на спектрофотометре UV-VIS 1700 (“Shimadzu”, Япония).

Хроматографическое разделение исследованных соединений в тонком слое сорбента было проведено на пластинках Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (“Merck”, Германия) в системе четыреххлористый углерод — спирт этиловый 95 % — концентрированный раствор аммиака (100:50:3) по методике, разработанной ранее для субстанции I [2]. Обнаружение зон адсорбции проводили в УФ-свете с длиной волны 254 нм и в парах йода.

Изучение хроматографической подвижности I, компонентов его лекарственной формы, а также вероятных примесей с помощью ВЭЖХ выполнено на жидкостном хроматографе с градиентным насосом и спектрофотометрическим детектором с переменной длиной волны (“Beckman”, США). Для разделения использовали стальные колонки внутренним диаметром 4,6 мм и длиной 150 и 250 мм, заполненные сорбентом C<sub>18</sub> с размером частиц 5 мкм (“Luna C18(2)”).

### Результаты и их обсуждение

При визуальном осмотре капсул I установлено, что они имеют форму цилиндра с полусферическими концами, гладкую поверхность синего цвета, надписи отсутствуют.

Средняя масса невскрытых капсул составляла 0,3136 г, отклонения от средней массы капсул не превышали 10 % и фактически составляли ± 6,3 %. Средняя масса содержимого капсул составляла 0,2429 г, отклонения от средней массы не превышали 10 % и фак-

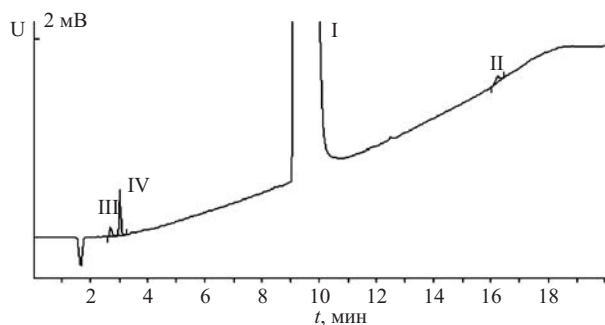


Рис. 1. Хроматограмма модельной смеси I и веществ-свидетелей II – IV.

тически составляли  $\pm 6,8\%$ . Время распадаемости составляло от 3 до 4,5 мин.

Для проведения анализа чистоты капсул I методом ТСХ в качестве экстрагента для извлечения действующего вещества и возможных примесей из содержимого капсул был выбран хлороформ. На линию старта нанесли хлороформное извлечение в объеме, эквивалентном 200 мкг I.

Содержание посторонних примесей оценивали визуально, путем сравнения величины и интенсивности зон адсорбции примесей и растворов рабочего стандартного образца I, нанесенных на хроматографическую пластинку в количестве, эквивалентном 0,4 мкг (0,2%), 0,2 мкг (0,1%) и 0,1 мкг (0,05%) I.

Пригодность хроматографической системы оценивали по следующим параметрам: на хроматограмме свидетеля I, нанесенного в количестве 0,1 мкг, должно быть четко видно пятно; значение  $R_s$  IV относительно I должно быть около  $0,18 \pm 0,02$ .

При анализе капсул I при выпуске в образцах обнаружено до 2 неидентифицированных примесей с  $R_f$  около 0,23 и 0,29, проявляющихся при УФ-освещении и в парах йода. Содержание индивидуальной примеси не превышало 0,1%. Сумма примесей не превышала 0,2%. Примеси II, III и IV в капсулах не обнаружены. Вспомогательные вещества проведению анализа не мешали.

Таким образом, показано, что разработанная ранее для анализа субстанции I методика ТСХ может быть применена и для анализа капсул. Однако, согласно полученным ранее данным, разделение технологических примесей 2 последних стадий синтеза субстанции (II и III), а также неидентифицированных примесей методом ТСХ происходит неполно [2], поэтому было принято решение о применении более чувствительного и селективного метода ВЭЖХ для анализа чистоты как субстанции, так и лекарственной формы I.

Нами изучена хроматографическая подвижность I и его примесей в смесях, включавших ацетонитрил, метанол, воду, добавки органических кислот (ледяной уксусной кислоты и фосфорной кислоты) и щелочных агентов (0,1 М NaOH), фосфатных буферных растворов.

Изучение параметров разделения I и его примесей проводили на модельных растворах I и вероятных

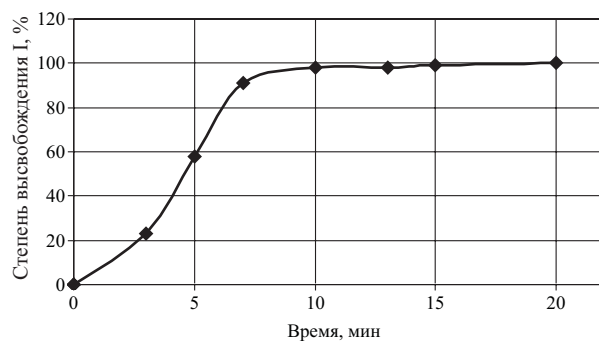


Рис. 2. Зависимость степени высвобождения I из капсул от времени.

примесных соединений. Детектирование проводили в диапазоне длин волн от 205 до 220 нм с учетом совпадения максимумов областей поглощения в УФ-области спектра растворов всех исследуемых соединений.

В кислых подвижных фазах вне зависимости от их состава в изократическом режиме удовлетворительного разделения всех имеющихся соединений добиться не удалось.

В подвижных фазах с содержанием водного компонента от 45% по объему и выше наблюдалось удовлетворительное разделение пары примесей III и IV, но времена удерживания I и примеси II в большинстве случаев превышали 15 и 30 мин соответственно. В подвижных фазах с высоким содержанием органического компонента времена удерживания I и примесей за исключением II не превышали 12 мин, но разделения примесей III и IV, а также отдельных неидентифицированных примесей, присутствовавших в субстанции, не происходило.

Введение 0,02 М фосфатного буфера в состав подвижной фазы позволило получить более узкий и симметричный пик I (ширина на высоте 5% от базовой линии около 1 мин), но не повлияло на хроматографическое разделение компонентов смеси.

От детальных исследований с использованием подвижных фаз основного характера отказались в связи с тем, что время удерживания I в таких подвижных фазах составляло более 17 мин, а кроме того наблюдалась выраженная асимметрия его пика.

С учетом полученных результатов изучено хроматографическое поведение I и его вероятных примесей в градиентном режиме.

При разработке методики использовали в различных соотношениях 0,02 М фосфатный буфер в качестве слабого компонента элюента, а в качестве сильного — смесь ацетонитрила и метанола (1:1).

Удовлетворительного разделения всех имеющихся компонентов смеси удалось добиться при элюировании исследуемых соединений с помощью линейного градиента, с применением 2 подвижных фаз: 0,02 М фосфатный буфер с pH 3,3 (подвижная фаза А, ПФ А), смесь ацетонитрил — метанол — 0,02 М фосфатный буфер с pH 3,3 (50:50:20) (подвижная фаза Б, ПФ Б), скорость 1 мл/мин (табл. 1). Хроматографирование

проводили с использованием градиента от 65 до 100 % элюента Б за 15 мин.

Использование более короткой колонки (150 мм) позволило сократить общее время анализа с сохранением эффективности разделения. В качестве рабочей концентрации была выбрана концентрация I 2 мг/мл, аналитическая длина волны 210 нм.

Хроматограмма модельной смеси I (концентрация в пробе 2 мг/мл) и его примесей около 0,004 мг/мл (0,2 %) представлена на рис. 1. Времена удерживания, пределы обнаружения и параметры разделения I и веществ-свидетелей представлены в табл. 2.

На основании полученных результатов разработана методика определения посторонних примесей: хроматографирование проводится на колонке  $C_{18}$ ,  $150 \times 4,6$  мм (5 мкм), ПФ А 0,02 М фосфатный буфер с рН 3,3, ПФ Б — смесь ацетонитрил — метанол — 0,02 М фосфатный буфер с рН 3,3 (50:50:20), скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин, режим элюирования градиентный, температура колонки комнатная, длина волны детектирования 210 нм, концентрация испытуемого раствора 2 мг/мл, объем пробы 20 мкл. Общее время анализа составляет 25 мин.

В указанных условиях проанализированы образцы субстанции и капсул I.

Для этого около 0,05 г (точная навеска) субстанции I помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в подвижной фазе состава 35 частей ПФ А — 65 частей ПФ Б (начальный состав), доводили объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивали (испытуемый раствор с концентрацией 2 мг/мл).

При анализе капсул I методом ВЭЖХ для приготовления испытуемого раствора осторожно вскрывали 20 капсул, как можно полнее извлекали их содержимое и перемешивали. Далее 0,125 г (точная навеска) капсульной массы помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, встряхивали с 15 мл подвижной фазы начального состава в течение 10 мин, доводили объем до метки подвижной фазой и перемешивали (испытуемый раствор с концентрацией 2 мг/мл).

Для доказательства отсутствия влияния вспомогательных веществ на результаты анализа был приготовлен раствор плацебо таким же образом, как и извлечение из капсульной массы.

Содержание единичной примеси в препарате оценивали методом внешнего стандарта (стандарт — раствор рабочего стандартного образца (РСО) I в подвижной фазе начального состава с концентрацией 0,004 мг/мл).

Для проверки пригодности хроматографической системы готовили раствор I и IV с концентрациями 0,05 и 0,025 мг/мл соответственно. Пригодность хроматографической системы оценивали по эффективности хроматографической колонки (не менее 5000 теоретических тарелок), коэффициенту асимметрии пика I (не более 1,5), относительному стандартному отклонению, рассчитанному для площадей пиков I в 5 параллельных измерениях (не более 2 %) и относительному времени удерживания IV (около 0,30).

Идентификацию примесей проводили, сопоставляя относительные времена удерживания пиков, полученные на хроматограммах анализируемых проб, с относительными временами удерживания пиков, полученными при элюировании модельных растворов I и имеющих свидетелей примесных соединений.

Анализ 6 образцов субстанции I показал наличие в них до 4 неидентифицированных примесей с относительными временами удерживания около 0,40; 0,48; 0,45; 0,86 и 1,36. Содержание индивидуальной примеси в субстанции I не превышало 0,2 %, а их суммарное содержание — 0,3 %. Технологические примеси II и III, а также примесь IV в образцах субстанции не обнаружены.

В образцах капсул I обнаружено до 4 неидентифицированных примесей с относительными временами удерживания 0,48; 0,86; 1,36 и 1,82, 3 из которых присутствовали также и в образцах субстанции (примеси с относительными временами удерживания 0,48; 0,86 и 1,36). Пики, принадлежавшие вспомогательным веществам, на хроматограммах не обнаружены.

Содержание индивидуальной примеси в капсулах I не превышало 0,1 %, а их суммарное содержание — 0,2 %. Примеси II, III и IV не обнаружены.

Таким образом, разработанная методика ВЭЖХ для анализа субстанции и лекарственной формы I позволяет разделить технологические примеси 2 последних стадий синтеза субстанции I, примесь IV и ряд неидентифицированных примесей, которые предположительно могут является продуктами фотодеструкции I. Методика позволяет надежно подтвердить отсутствие технологических примесей II, III и IV в образцах субстанции и лекарственной формы I.

Количественное содержание I в капсулах определено с помощью методов УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ.

Таблица 1

**Хроматографический режим**

Время, мин	% ПФ А	% ПФ Б	Режим
0 – 15	35 → 0	65 → 100	линейный градиент
15 – 20	0	100	изократический
20 – 25	35	65	переход к начальному составу
25 – 0	35	65	начало новой программы

Таблица 2

**Времена удерживания, пределы обнаружения и параметры разделения I и его вероятных примесей**

Соединение	Время удерживания ( $t_{уд}$ ), мин	Относительное время удерживания $t_{отн}$	Пределы обнаружения, мг/мл (мкг) 210 нм	$R_s$ соседних пар
III	$2,71 \pm 0,03$	$0,26 \pm 0,001$	0,0005 (0,01)	—
IV	$3,06 \pm 0,008$	$0,30 \pm 0,003$	0,0002 (0,004)	1,58
I	$10,29 \pm 0,09$	1,00	0,0002 (0,004)	5,71
II	$16,32 \pm 0,02$	$1,59 \pm 0,010$	0,002 (0,04)	5,89

Таблица 3  
Результаты количественного определения образцов капсул I (100 мг) методом УФ-спектрофотометрии

Показатель	Номер серии		
	010308	020308	030308
Количественное содержание, мг	98,30	99,60	100,30
Метрологические характеристики ( $P = 95\%$ , $n = 5$ )	$S = 0,00038$ $\Delta\bar{X} = 0,00047$ $\bar{\varepsilon} = 0,48\%$	$S = 0,00062$ $\Delta\bar{X} = 0,00077$ $\bar{\varepsilon} = 0,77\%$	$S = 0,00045$ $\Delta\bar{X} = 0,00056$ $\bar{\varepsilon} = 0,56\%$

Разработка методики УФ-спектрофотометрического определения количественного содержания I в капсулах проведена на модельных смесях субстанции I и плацебо в соотношении, аналогичном составу капсулы; в качестве растворителя для проб использовали воду очищенную.

Максимум поглощения I в водном растворе находился в пределах интервала  $269 \pm 2$  нм, линейная зависимость оптической плотности от концентрации при 269 нм соблюдалась в интервале от 0,01 до 0,4 мг/мл (коэффициент корреляции + 0,999). При концентрации I в испытуемом растворе 0,04 мг/мл оптическая плотность составляла около 725, эта концентрация и была выбрана в качестве рабочей.

Исследования показали, что раствор плацебо при аналитической длине волны (269 нм) практически не поглощал, а относительная ошибка количественного определения I в модельных смесях не превышала 2 %.

В результате разработана следующая методика количественного определения I в капсулах: 0,125 г (точная навеска) порошка капсульной массы помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 15 мл воды очищенной и встряхивают в течение 5 мин. Затем доводят объем раствора водой до метки, фильтруют через фильтр типа “Миллипор” с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые порции фильтрата. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1 мл полученного раствора, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают (испытуемый раствор). Параллельно готовят раствор РСО I с концентрацией 0,04 мг/мл. Оптическую плотность испытуемого раствора и раствора РСО измеряют при длине волны 269 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

По приведенной выше методике рассчитано количественное содержание I в капсулах, которое составило от 98,3 до 100,3 мг в капсуле (табл. 3).

Для проведения теста “Растворение” выбраны следующие условия: тест проводится на приборе “Вращающаяся корзинка”, среда растворения — вода очищенная, 500 мл, температура среды растворения —  $37 \pm 1$  °С, скорость вращения корзинки — 100 об/мин. Пробы фильтруют через фильтр “Миллипор” с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые порции фильтрата, 5 мл полученного фильтрата помещают в колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора до метки водой очищенной.

Таблица 4  
Результаты количественного определения образцов капсул I (100 мг) методом ВЭЖХ

Показатель	Номер серии		
	010308	020308	030308
Количественное содержание, мг	98,14	99,14	99,78
Метрологические характеристики ( $P = 95\%$ , $n = 5$ )	$S = 0,00021$ $\Delta\bar{X} = 0,00026$ $\bar{\varepsilon} = 0,26\%$	$S = 0,00035$ $\Delta\bar{X} = 0,00043$ $\bar{\varepsilon} = 0,43\%$	$S = 0,00016$ $\Delta\bar{X} = 0,00020$ $\bar{\varepsilon} = 0,20\%$

Параллельно готовят раствор РСО с концентрацией 0,04 мг/мл.

Измеряют оптическую плотность полученного раствора и раствора РСО при длине волны 269 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

С помощью приведенной выше методики изучена кинетика высвобождения I из капсул (рис. 2) и показано, что за 15 мин из всех образцов капсул в раствор переходит не менее 95 % действующего вещества.

Альтернативно количественное содержание I в капсулах определяли с помощью методики ВЭЖХ, разработанной для определения посторонних примесей, однако в качестве аналитической была выбрана специфическая длина волны — 269 нм.

Показано, что при 269 нм прямолинейная зависимость отклика детектора (площади пика) от концентрации I в модельных растворах наблюдалась в интервале от 0,001 до 1 мг/мл (коэффициент корреляции 0,999). Предел обнаружения I — 0,01 мкг (20 мкл раствора с концентрацией 0,0005 мг/мл), предел количественного определения — 0,02 мкг (20 мкл раствора с концентрацией 0,001 мг/мл). На основании полученных данных выбрана рабочая концентрация раствора I — 0,5 мг/мл.

На модельных смесях плацебо и I с концентрацией от 80 до 120 % от концентрации I в испытуемом растворе ( $0,5$  мг/мл  $\pm 20\%$ ) показано, что относительная ошибка количественного определения I не превышает 1 %.

В результате для количественного определения I в капсулах методом ВЭЖХ разработана следующая методика: около 0,625 г (точная навеска) порошка капсульной массы вносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, встряхивают с 50 мл воды очищенной в течение 10 мин, доводят объем раствора до метки тем же растворителем, перемешивают и фильтруют через фильтр типа “Миллипор” с диаметром пор 0,45 мкм или бумажный фильтр “синяя лента”. Помещают 5 мл полученного раствора в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят подвижной фазой начального состава до метки, перемешивают. Параллельно готовят раствор РСО с концентрацией 0,5 мг/мл.

Тест “Пригодность хроматографической системы” проводят так же, как и при определении показателя “Посторонние примеси”.

Анализ образцов капсул I показал, что количественное содержание в них I составляло от 98,10 мг до



99,78 мг в капсуле (табл. 4). Пики, принадлежащие вспомогательным веществам, на хроматограммах не обнаружены.

Таким образом, исследования по разработке методик анализа капсул I показали, что определение содержания посторонних примесей возможно проводить и методом ТСХ, и ВЭЖХ, а количественное содержание – с помощью методов УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ.

В качестве основного метода для определения показателей “Посторонние примеси” и “Количественное определение” был выбран метод ВЭЖХ как более селективный и точный. Однако определение теста “Растворение” из-за большого количества проб удобнее и

экономичнее проводить с помощью метода УФ-спектрофотометрии.

Подлинность капсул I предложено определять с помощью методов УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ по соответствию максимумов спектров и времен удерживания испытуемого раствора и раствора РСО.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. Зауер, Р. Шиндлер, К. Рюгер и др., Патент РФ № 2134683, *Бюл. изобрет.*, № 23 (1999).
2. Л. Н. Грушевская, О. Б. Степаненко, Н. И. Авдюнина и др., *Хим.-фарм. журн.*, **41**(8), 42 – 45 (2007).

Поступила 04.03.10

## DEVELOPING METHODS FOR THE ANALYSIS OF SOLID DOSAGE FORM (CAPSULES) OF CARDIOCYCLIDE

M. S. Sergeeva, L. N. Grushevskaya, B. M. Pyatin, K. V. Alekseev, N. I. Avdyunina, and E. V. Blynskaya

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

We have developed methods for the pharmaceutical analysis of a new antiarrhythmic drug cardiocyclide in solid dosage form (capsules). The main pharmacopoeial tests were carried out and the content of impurities in capsules was determined by thin-layer chromatography. Ultraviolet spectrophotometry and gradient high-performance liquid chromatography were used for simultaneous assay, purity check, and quantitative analysis of the drug. The pharmacopoeial dissolution test was carried out using ultraviolet spectrophotometry.

**Key words:** Cardiocyclide, capsules, thin-layer chromatography, gradient high performance liquid chromatography, UV spectrophotometry