

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2010

Г. М. Хомушку, А. А. Жлоба, В. С. Пучнин, М. В. Архипова, С. М. Моисеева

АНАЛИЗ ИНГИБИТОРОВ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА — ПЕРИНДОПРИЛА, ЛИЗИНОПРИЛА И ХИНАПРИЛА МЕТОДОМ ВЭЖХ

Обнинская химико-фармацевтическая компания, Обнинск, Россия

Предложены унифицированные ВЭЖХ методики анализа ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) — периндоприла, лизиноприла и хинаприла — с использованием одной колонки с неполярной фазой на основе октадецилсиликагеля и универсального элюэнта (смесь ацетонитрил — водный раствор гептансульфонокислоты и триэтиламина), что позволяет существенно сократить трудоемкость и стоимость анализов. Методики могут быть использованы при анализе субстанций и различных лекарственных форм, содержащих ингибиторы АПФ.

Ключевые слова: периндоприл, лизиноприл, хинаприл, определение, ВЭЖХ.

Совершенствование методов контроля качества лекарственных препаратов, широко используемых для лечения артериальной гипертензии — ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) — является актуальной проблемой современной фармакологии. В настоящее время в фармакопейном анализе лекарственных средств данной группы, в частности лизиноприла, хинаприла и периндоприла, используется метод ВЭЖХ, обладающий достаточно высокой чувствительностью и селективностью и позволяющий одновременно контролировать как основное вещество, так и примеси. Однако для каждого из препаратов рекомендуется методика анализа, предполагающая использование индивидуальных неподвижных (НПФ) и подвижных фаз (ПФ) — хроматографических колонок и элюентов [1 – 13]. Цель настоящего исследования — предложить унифицированные НПФ и ПФ, пригодные для анализа лизиноприла, периндоприла и хинаприла, что позволило бы существенно понизить трудоемкость и стоимость анализа.

Экспериментальная часть

Для проведения хроматографических анализов использовали жидкостный хроматограф фирмы Shimadzu марки LC 10. Детектирование осуществляли с помощью спектрофотометрического детектора SPD-10AVP при длинах волн: 215 нм (периндоприл), 210 нм (лизиноприл) и 214 нм (хинаприл). Использовали следующие колонки для ВЭЖХ: Inertsil C8-3 размером 150 · 4,6 мм; Inertsil ODS 3V размером 250 · 4,6 мм; Supelcosil C₈ размером 250 · 4,6 мм, диаметр частиц сорбента составлял 5 мкм.

В работе использовали химические реактивы квалификации не ниже х.ч., ацетонитрил — Криохром, сорт 4 о.с.ч. для ВЭЖХ, натриевую соль гептансульфонокислоты фирмы Fluka для ион-парной хроматогра-

фии, триэтиламин фирмы Panreac с содержанием основного вещества не менее 99,5 %.

Для приготовления растворов субстанций использовали следующие стандартные образцы: стандартный образец периндоприла European pharmacopoeia perindopril for system suitability CRS EPY0000206 [7], стандартный образец лизиноприла European pharmacopoeia Lisinopril dehydrate for performance test CRS EPL0702100 [8], субстанция хинаприла гидрохлорида Aarti Industries Limited Quinapril HCL AN/0503/496. Растворы субстанций готовились растворением точной навески препарата в соответствующей подвижной фазе.

В ВЭЖХ методиках, описанных в литературе для определения периндоприла, лизиноприла и хинаприла, а также других препаратов подобной структуры, используется в основном обращенно-фазовый (ОФ) вариант ВЭЖХ: НПФ — различные колонки с неполярной НПФ. В качестве элюентов рекомендуются смеси ацетонитрил (либо метанол — тетрагидрофуран) — фосфатный буферный раствор с pH от 2 до 5 [4 – 6, 8, 9] (лизиноприл и периндоприл), а также смеси ацетонитрил — вода с добавками гептансульфонокислоты и триэтиламина [10] (периндоприл), ацетонитрил — тетрагидрофуран — вода с добавками гептансульфонокислоты [1] либо тетрабутиламмония [7], смесь вода — ацетонитрил — метансульфоновая кислота [11] (хинаприл). В фармакопее USP [11] в качестве НПФ используется колонка с цианпропилсиликагелем.

Основная проблема ОФ ВЭЖХ ионогенных соединений — это уширение хроматографических пиков, часто обусловленное существованием на поверхности сорбента нескольких форм соединений. Такое поведение, в частности, описано для лизиноприла и хинаприла [2, 10 – 13]. При разработке методик количественного определения основного вещества и примесей

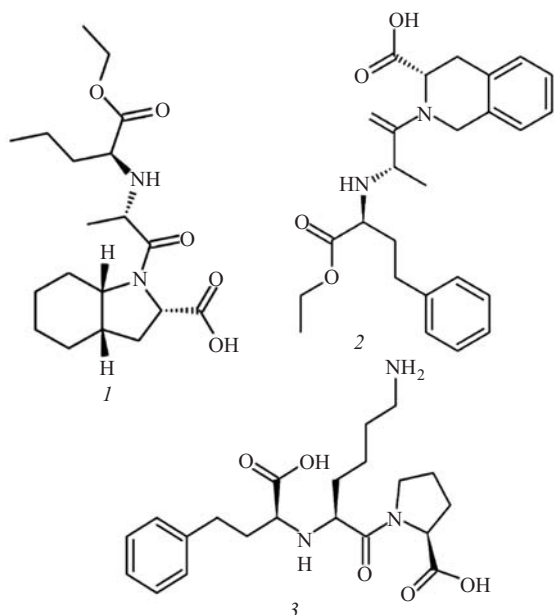


Рис. 1. Структурные формулы ингибиторов АПФ: 1 — периндоприл, 2 — хинаприл, 3 — лизиноприл.

в лекарственных препаратах необходимо обеспечить условия анализа, приводящие к получению узкого единичного хроматографического пика путем подбора соответствующих ПФ и НПФ.

Анализ литературных данных дает возможность предположить, что для периндоприла, лизиноприла и хинаприла (см. рис. 1) и соединений со сходной структурой могут быть найдены универсальные условия определения. При реализации режима ОФ ВЭЖХ такими будут являться:

НПФ — универсальная колонка с неполярной фазой на основе силикагеля, химически модифицированного алкилсиланами C_8 , C_{16} или C_{18} с дополнительной блокировкой остаточных силанольных групп, обеспечивающая сорбцию преимущественно за счет неспецифических взаимодействий (ОФ механизм). Нами были использованы колонки Inertsil C8-3 размером $150 \cdot 4,6$ мм и Inertsil ODS 3V размером $250 \cdot 4,6$ мм.

ПФ — универсальная ПФ для ОФ ВЭЖХ с использованием ион-парного режима (ИПР) на основе смеси ацетонитрил — вода с добавками ион-парных агентов и динамических модификаторов (алкиламин, алкилсульфокислота, например триэтиламин — ТЭА и гептансульфокислота — ГСК), поскольку в молекулах данных соединений находятся как кислотные, так и основные (амино) группы. Использование ИПР уменьшает гидрофильность сорбата, увеличивает его удержание на неполярной НПФ и уменьшает уширение пиков, вызванное взаимодействием полярных групп с остаточными силанольными фрагментами сорбента. ТЭА часто применяется для дополнительного блокирования поверхности силикагеля (динамическое модифицирование) при анализе азотсодержащих соединений [14]. ИПР может оказаться наиболее эффективен при разделении основного вещества, содержащего ио-

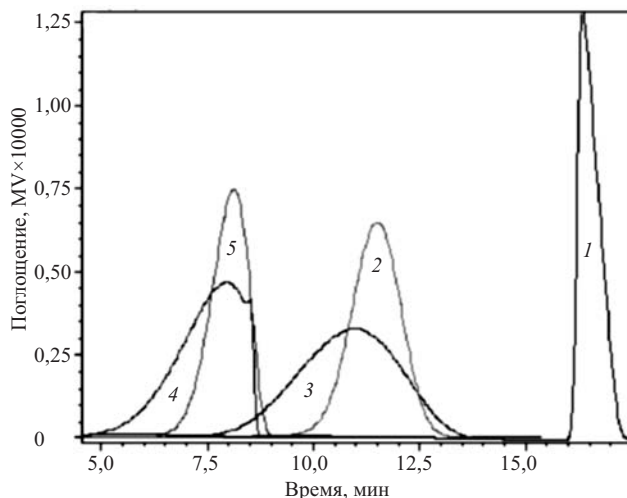


Рис. 2. Хроматограмма растворов субстанции периндоприла. $C_{\text{периндоприла}} = 4$ мг/мл; 1 — pH 2 ГСК без ТЭА, $T = 70$ °C ($N = 3900$), 2 — pH 4,5 ГСК и ТЭА, $T = 70$ °C ($N = 400$), 3 — pH 4,5 ГСК и ТЭА, $T = 25$ °C ($N = 80$), 4 — pH 6,3 ГСК и ТЭА $T = 25$ °C ($N = 130$), 5 — pH 6,3 ГСК и ТЭА $T = 70$ °C ($N = 370$).

низированные функциональные группы, и его приме-сей, имеющих сходную структуру.

Для выбора универсальной ПФ было изучено влияние pH среды и ион-парных добавок на хроматографическое поведение одного из выбранных соединений — периндоприла. Для этих целей была использована колонка Inertsil C8-3 размером $150 \cdot 4,6$ мм, позволившая сократить время анализа при реализации того же ОФ механизма ВЭЖХ.

Результаты и их обсуждение

Влияние pH подвижной фазы. На рис. 2 представлены хроматограммы стандартного образца периндоприла, полученные с использованием ПФ, состоящей из 20 % ацетонитрила и 80 % водной фазы, содержащей 0,005 М ГСК и 0,007 М ТЭА с различным значением pH. Соответствующее значение pH создавалось добавлением растворов хлорной кислоты. Концентрация ион-парной добавки выбиралась в соответствии с [14] в интервале 0,001 – 0,01 М. Скорость ПФ составляла 1,5 мл/мин.

Как видно из рис. 2, с увеличением pH удерживание уменьшается, при этом происходит уширение пика (число теоретических тарелок N падает почти в 10 раз с 3900 до 400). Понижение температуры колонки также приводит к уширению пика, а при pH 6,3 при 25 °C наблюдается также и расщепление пика. В работе [15] предполагается, что уширение хроматографического пика ионогенного соединения в ОФ ВЭЖХ может свидетельствовать о существовании различных форм соединения на поверхности адсорбента — ионизированной, молекулярной, ассоциированной. Каждая из форм имеет свое время удерживания и в результате пик уширяется. Кроме того, как было отмечено в [10 – 13, 16], для пептидов и родственных им соединений, содержащих пролиновый остаток (а к ним относятся также периндоприл и лизиноприл), возможно существ-

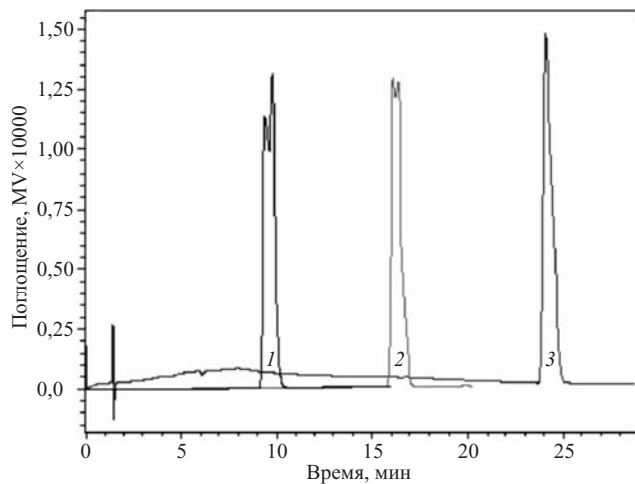


Рис. 3. Хроматограммы растворов субстанции периндоприла (рН = 2,0). $C_{\text{периндоприла}} = 4$ мг/мл. 1 — без ТЭА и ГСК, 2 — ТЭА без ГСК, 3 — ГСК и ТЭА.

ование стереоизомеров, получаемых путем вращения вокруг амидной связи (*цис-транс*-изомеры) вследствие сравнительно невысокого активационного барьера реакции изомеризации (13 ккал/моль). Если константа равновесия реакции изомеризации меньше константы адсорбционно-десорбционного равновесия, то хроматографические пики *цис-транс*-изомеров разделяются. При этом *цис*-изомер более гидрофобен, сильнее удерживается неполярной ОФ и имеет большее время удерживания [12]. С увеличением рН удерживание обоих изомеров уменьшается, поскольку удерживание цвиттер-ионов меньше удерживания катионных форм.

Таким образом, как видно из рис. 2, оптимальным является рН 2 (кислотные группы находятся в молекулярной форме, а слабоосновные протонированы и участвуют в образовании ассоциата с ГСК). При этом константа равновесия реакции *цис-транс*-изомеризации больше, чем константа адсорбционно-десорбционного равновесия ассоциатов периндоприла с ГСК, и наблюдается единственный узкий хроматографический пик. Кроме того, для получения узкого единичного пика нужно термостатировать колонку при температуре выше 25 °С. В дальнейшем исследования проводились при рН 2 и $T = 70$ °С.

Влияние добавок ион-парного агента. Для исследования было выбрано значение рН подвижной фазы, равное 2, с добавками и без добавок ТЭА (0,007 М) и ГСК (0,005 М).

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы (см. рис. 3):

В отсутствие ТЭА и ГСК время удерживания меньше, пик расщеплен, т.е. хроматографически фиксируется наличие нескольких форм периндоприла.

В присутствии ТЭА при рН 2 удерживание увеличивается, пик также расщеплен.

В присутствии ГСК при рН 2 удерживание еще более увеличивается, поскольку ионные ассоциаты периндоприла с ГСК лучше удерживаются на ОФ поверхности (возрастает площадь неполярной поверхно-

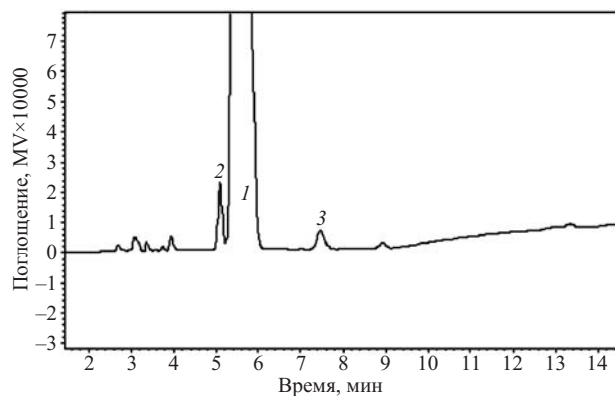


Рис. 4. Хроматограмма тест раствора стандартного образца лизиноприла и примесей. $C_{\text{лизиноприла}} = 2$ мг/мл. 1 — лизиноприл, 2 — примесь А, 3 — примесь Б.

сти ассоциата и, следовательно, возрастает удерживание за счет неспецифических взаимодействий). При этом расщепления пика нет.

При добавлении ТЭА к ПФ, содержащей ГСК, время удерживания не изменяется, однако фактор симметрии (τ_F) уменьшается с 2,0 до 1,8.

Таким образом, наилучшая эффективность хроматографического анализа (т.е. наибольшее число теоретических тарелок и единственный узкий хроматографический пик) получена при температуре 70 °С и рН = 2,0, с подвижной фазой, содержащей ГСК в качестве ион-парной добавки. Для дополнительной модификации поверхности силикагеля добавляется ТЭА. Данную подвижную фазу предполагалось использовать как универсальную и для определения лизиноприла и хинаприла и их примесей.

В дальнейшем для определения периндоприла в присутствии его примесей, а также для определения лизиноприла и хинаприла использовали более длинную колонку с аналогичной ОФ — Inertsil ODS 3V размером 250 · 4,6 мм. При проведении хроматографического анализа соединений с сильно различающимися временами удерживания целесообразно использовать градиентный режим элюирования, увеличивая содержание ацетонитрила в ПФ для ускорения элюирования наиболее удерживаемых соединений. Нами был выбран следующий режим: 1 ступень (0 – 3 мин) 100 % подвижная фаза А (смесь 30 % ацетонитрила и 70 % водной фазы на основе ГСК и ТЭА), 2 ступень (3 – 25 мин) — содержание элюэнта А уменьшалось до 70 %, содержание элюэнта Б (ацетонитрил) увеличивалось с 0 до 30 %.

Для оценки пригодности хроматографической системы использовали стандартный образец периндоприла и его примесей [7]. Оценку пригодности проводили по критериям, описанным в Европейской фармакопее [7]. Число теоретических тарелок, характеризующее эффективность хроматографического процесса, достаточно велико — $N = 7700$, τ_F не более 2,0, хроматографическое поведение примесей также удовлетворяет условиям [7]: коэффициент разделения пиков (peak to valley ratio) $p/v = h_d/h_v$ должен быть более 10 для при-

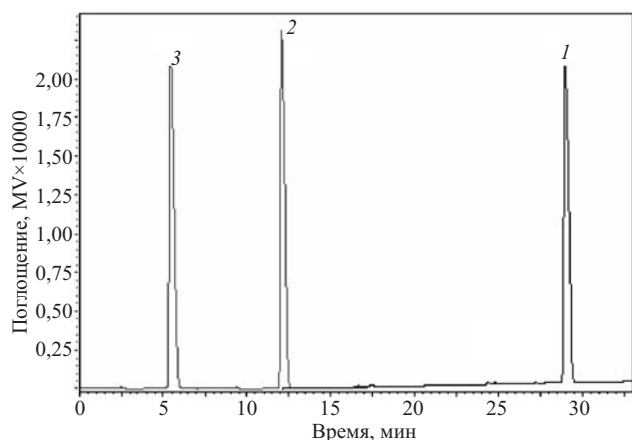


Рис. 5. Хроматограмма субстанции хинаприла. $C_{\text{хинаприла}} = 2$ мг/мл. Содержание ацетонитрила в ПФ: 1 – 30 % ($N = 24000$), 2 – 45 % ($N = 10000$), 3 – 50 % ($N = 1600$)

меси D ((2S)-2-[(3S,5aS,9aS,10aR)-3-метил-1,4-диоксодекагидропиразино[1,2-*a*]индол-2-(1H)-ил]-пентановая кислота) и основного вещества, а в выбранных нами условиях пики полностью разделены и разрешение пиков $R = 2,5$. Относительные стандартные отклонения времени удерживания пика периндоприла $S_r(\tau)$ и площади пика $S_r(S)$, характеризующие воспроизводимость метода, достаточно высоки: $S_r(\tau) < 1\%$, $S_r(S) = 0,5\%$ ($n = 5$).

Выбранные подвижная и неподвижная фазы были использованы и для изучения возможности определения лизиноприла и хинаприла.

Определение лизиноприла. Методика ОФ ВЭЖХ, предложенная в Европейской фармакопее [8] для определения лизиноприла, предполагает использование колонки Supelcosil C₈ размером 250 · 4,6 мм, а в качестве элюэнта смеси ацетонитрил — вода (фосфатный буферный раствор с pH = 5, температура колонки 50 °С). При этом необходимо тщательно контролировать все параметры. Проведенные нами опыты с использованием рекомендованной колонки и элюэнта показали, что при смещении pH на 0,2 единицы, уменьшении содержания ацетонитрила на 2 – 3 % и понижении температуры на несколько градусов пик лизиноприла может уширяться, и в ряде случаев расщепляться, что указывает на существование в растворе нескольких форм лизиноприла и согласуется с данными [3, 10].

Для унификации методик определения ингибиторов АПФ была взята колонка Inertsil ODS 3V размером 250 · 4,6 мм и ПФ, аналогичная подобранной для определения периндоприла : смесь 30 % ацетонитрил — 70 % водная фаза на основе ГСК и ТЭА — фаза А, и фаза Б — ацетонитрил, температура колонки 50 °С. Скорость потока ПФ составляла 1,8 мл/мин. Градиентный режим подбирался экспериментально: 1 ступень (0 – 15 мин) 100 % подвижная фаза А (смесь 30 % ацетонитрила и 70 % водной фазы на основе ГСК и ТЭА), 2 ступень (15 – 27 мин) — содержание элюэнта А уменьшалось до 70 %, содержание элюэнта Б (ацетонитрил) увеличивалось с 0 до 30 %.

Некоторые хроматографические характеристики ингибиторов АПФ

Соединение	Время удерживания, мин	N^*	$S_r(S)$, %** ($n = 5$)	Разрешение пиков
Периндоприл	11,5	7700	0,5	$h_D/h_V > 10$, $R = 2,5$
Лизиноприл	5,6	2700	0,5	$h_A/h_V = 10$, $R = 1,7$
Хинаприл	12,2	10000	0,3	–

* — число теоретических тарелок, ** — относительное стандартное отклонение площади пика.

Для оценки пригодности хроматографической системы использовали стандартный образец лизиноприла и примесей [8]. Оценку пригодности проводили по критериям, описанным в Европейской фармакопее [8]. Как видно из хроматограммы (рис. 4), для лизиноприла с использованием унифицированной ПФ и НПФ получен единичный хроматографический пик с числом теоретических тарелок 2700, фактором симметрии $\tau_F = 1,6$, а также хорошие параметры разделения пиков основного вещества и примеси А ((2RS)-2-амино-4-фенилбутановая кислота), разрешение $R = 1,7$, $h_A/h_V = 10$, что соответствует требованиям [8].

Определение хинаприла. Для определения хинаприла были использованы следующие условия анализа: НПФ — колонка Inertsil ODS 3V размером 250 · 4,6 мм и ПФ, аналогичная подобранной для определения периндоприла и лизиноприла : смесь ацетонитрила (30 %) и 70 % водной фазы с pH 2 и добавками ГСК и ТЭА — фаза А, фаза Б — ацетонитрил, температура колонки 50 °С. Скорость ПФ — 1,5 мл/мин, изократический режим. Установлено, что для сокращения времени анализа содержание ацетонитрила необходимо увеличить до 45 % (рис. 5). В этих условиях время выхода хинаприла составляет около 12 мин, число теоретических тарелок — 10000. Таким образом, использование универсальной методики позволяет достигать высокой эффективности определения хинаприла.

Некоторые хроматографические характеристики изученных соединений, полученные при использовании унифицированной ПФ и НПФ, приведены в таблице. Как видно из таблицы, они удовлетворяют основным критериям пригодности хроматографической системы, предъявляемым к ВЭЖХ методикам фармакопейного анализа [17].

Таким образом, на основании проведенных исследований можно предложить универсальную колонку для определения всех 3 изученных ингибиторов АПФ — периндоприла, лизиноприла и хинаприла (основного вещества и примесей) — колонку с неполярной неподвижной фазой на основе октадецилсиликагеля (Inertsil ODS 250 · 4,5 мм) и универсальную подвижную фазу, содержащую смесь ацетонитрила и водного раствора триэтиламина и гептансульфокислоты, pH = 2.

ЛИТЕРАТУРА

1. C. Abbara, G. Aymard, and S. Hinh, et al., *J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **766**(2), 199 – 207 (2002).
2. A. Kocijan, R. Grahek, and Do. Kocjan, *J. Chromatogr. B*, **755**, 229 – 235 (2001).
3. S. Bouabdallah, H. Trabelsi, and K. Bouzouita, *Biochem. Biophys. Methods*, **54**, 391 – 405 (2002).
4. V. Shinde, A. Trivegi, and P. Upadhyay, *Pharm. Biomed. Anal.*, **43**, 381 – 386 (2007).
5. A. El-Emam and S. Hansen, *J. Pharm. Biochem. Anal.*, **34**(1), 35 – 44 (2004).
6. K. Thompson, Z. Zhao, and J. Mazakas, et al., *Am. J. Health-System Pharmacy*, **60**(1), 69 – 74 (2003).
7. Perindopril tert-butylamine. European Pharmacopoeia 5.8 / 2007:2019.
8. Lisinopril dehydrate. European Pharmacopoeia 5.8 / 2007:1120.
9. N. Erk, *J. Pharm. Biochem. Anal.*, **26**(1), 43 – 52 (2001).
10. D. Bonazzi, R. Gotti, and V. Andrisano, et al., *J. Pharm. Biochem. Anal.*, **16**, 431 – 438 (1997).
11. Quinapril Hydrochloride. USP 30 (3089 – 3090) 2007.
12. R. Ledger and E. Stellwagen, *J. Pharm. Pharmacol.*, **57**, 845 – 850 (2005).
13. H. Trabelsi, S. Bouabdallah, and S. Sabah, *J. Chromatogr. A*, **871**, 189 – 1999 (2000).
14. В. Д. Шатц, О. В. Сахартова. *Высокоэффективная жидкостная хроматография*, Зинанте, Рига (1988).
15. С. Н. Сычев, *Методы совершенствования хроматографических систем и механизмы удерживания ГТУ*, Орел (2000).
16. D. Guo, C. Mant, and R. Holges, *J. Chromatogr.*, **386**, 205 – 222 (1987).
17. Н. А. Эпштейн, *Хим.-фарм. журн.*, **38**(4), 45 – 46 (2004).

Поступила 23.04.09

HPLC ANALYSIS OF ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME INHIBITORS PERINDOPRIL, LISINOPRIL AND QUINAPRIL

G. M. Khomushku, A. A. Zhloba, V. S. Puchnin, M. V. Arkhipova, and S. M. Moiseeva

Obninsk Chemical-Pharmaceutical Company, Obninsk, Russia

A new unified HPLC methods for determining angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors, specifically perindopril, lisinopril and quinopril, are proposed. The analyses are performed using a single reversed-phase column (filled with a nonpolar phase based on octadecylsilica gel) and universal acetonitrile – water eluent with heptanesulfonic acid and triethylamine. This system significantly reduces the cost of analysis and makes the procedure less laborious. The method can be used for the HPLC analysis of substances and various medicinal forms containing ACE inhibitors.

Key words: Perindopril, lisinopril, quinopril, determination, HPLC