

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2010

Л. Н. Грушевская¹, Н. И. Авдюнина¹, С. Е. Милкина¹, О. Б. Степаненко¹,
Б. М. Пятин¹, К. В. Алексеев¹, С. А. Сизяков¹

РАЗРАБОТКА МЕТОДИК АНАЛИЗА ИНЪЕКЦИОННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ АФОБАЗОЛА

¹ ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, Россия;

² ФГУ НЦЭСМП Росздравнадзора, Москва, Россия

Целью настоящих исследований являлась разработка методик фармацевтического анализа инъекционной лекарственной формы афобазола, нового отечественного препарата, обладающего селективными анксиолитическими и нейропротекторными свойствами. Были изучены физико-химические свойства раствора афобазола для инъекций, определено содержание посторонних примесей методами тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографии, разработаны методики определения подлинности и количественного определения препарата с помощью УФ-спектрофотометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Ключевые слова: афобазол, раствор для инъекций, фармацевтический анализ, тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография

Афобазол (I) — 5-этокси-2-[2-(морфолино)этил-тио]бензимидазола дигидрохлорид (рис. 1) — новый селективный анксиолитик, разработанный в ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН [1]. Фармакологические исследования I показали, что помимо анксиолитической активности, препарат проявляет и нейропротекторную активность [2]. Проявление нейропротекторных свойств, в свою очередь, сделало возможным применение I в комплексной терапии острых нарушений мозгового кровообращения, в связи с чем возникла необходимость в разработке инъекционной лекарственной формы препарата.

В НИИ фармакологии РАМН была разработана инъекционная лекарственная форма I в виде водного изотонического раствора с концентрацией 10 мг/мл. Целью настоящего исследования являлось изучение физико-химических свойств и разработка методик фармацевтического анализа раствора I для инъекций.

Экспериментальная часть

Исследования проводили на серийных образцах раствора I для инъекций, 10 мг/мл. Были определены физико-химические свойства препарата, относящиеся к фармакопейным показателям качества, разработаны методики определения подлинности, чистоты и количественного определения I в лекарственной форме.

В процессе исследований были использованы методы УФ-спектрофотометрии, тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

УФ-спектры для определения подлинности и значения поглощения растворов при количественном опре-

делении были получены на спектрофотометре UV-1700 (“Shimadzu”, Япония).

Определение чистоты образцов раствора I проведено методами ТСХ и ВЭЖХ.

Методика тонкослойной хроматографии была воспроизведена на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck). Хроматографирование проводили в системе ацетон — гексан — концентрированный раствор аммиака (20:20:0,5), а обнаружение зон адсорбции — в УФ-свете при длине волны 254 нм и в парах йода.

Изучение хроматографической подвижности растворов I для определения чистоты и количественного содержания методом ВЭЖХ было выполнено на жидкостных хроматографах Shimadzu (Япония) и Beckman (США), снабженных спектрофотометрическими детекторами с переменной длиной волны.

Разделение проводили на стальных колонках “Диасфер-110-С₁₈” (длина 150 мм, внутренний диаметр 4,0 мм, сорбент С₁₈ с размером частиц 7 мкм) [3] и “Luna С₁₈ (2)” (длина 250 мм, внутренний диаметр 4,6 мм, сорбент С₁₈ с размером частиц 5 мкм).

Результаты и их обсуждение

По внешнему виду все образцы лекарственной формы I представляли собой бесцветную или слегка окрашенную жидкость. Растворы были прозрачны, цветность их не превышала эталона 5б, значение рН находилось в пределах от 2,0 до 3,0.

В УФ-спектре растворов, разведенных 0,01 М раствором хлористоводородной кислоты до концентрации 0,015 мг/мл, в области длин волн от 210 до 350 нм

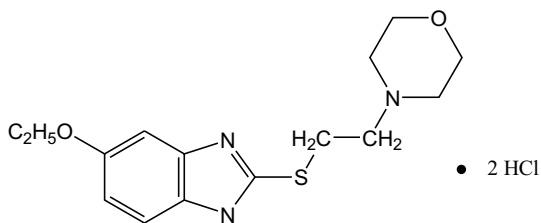


Рис. 1. Структурная формула I

наблюдался характерный для I максимум при длине волны $302,0 \pm 2$ нм (фактические данные о положении максимума спектров растворов I составляли $302,30 \pm 0,64$ нм).

Для проведения анализа чистоты инъекционного раствора I методом ТСХ действующее вещество и его примеси извлекали из водного раствора смесью хлороформ — диэтиламин (9:1) в соотношении водной и органической фазы 1:1. На линию старта наносили хлороформное извлечение в объеме, эквивалентном 100 мкг I. Детектирование зон адсорбции проводили в УФ-свете и в парах йода.

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 0,2 мкг (0,2 %) и 0,1 мкг (0,1 %) I.

Пригодность хроматографической системы оценивали по величине R_s I (R_f около 0,27) и 5-этокси-2-меркаптобензимидазола (R_f около 0,54), которая находилась в пределах $2,0 \pm 0,3$.

Анализ растворов при выпуске с помощью описанной выше методики показал наличие в образцах до 3 неидентифицированных примесей с R_f около 0,18, 0,36 и 0,42 (R_s 0,67, 1,33 и 1,56 соответственно) в содержании каждой индивидуальной примеси не более 0,2 %.

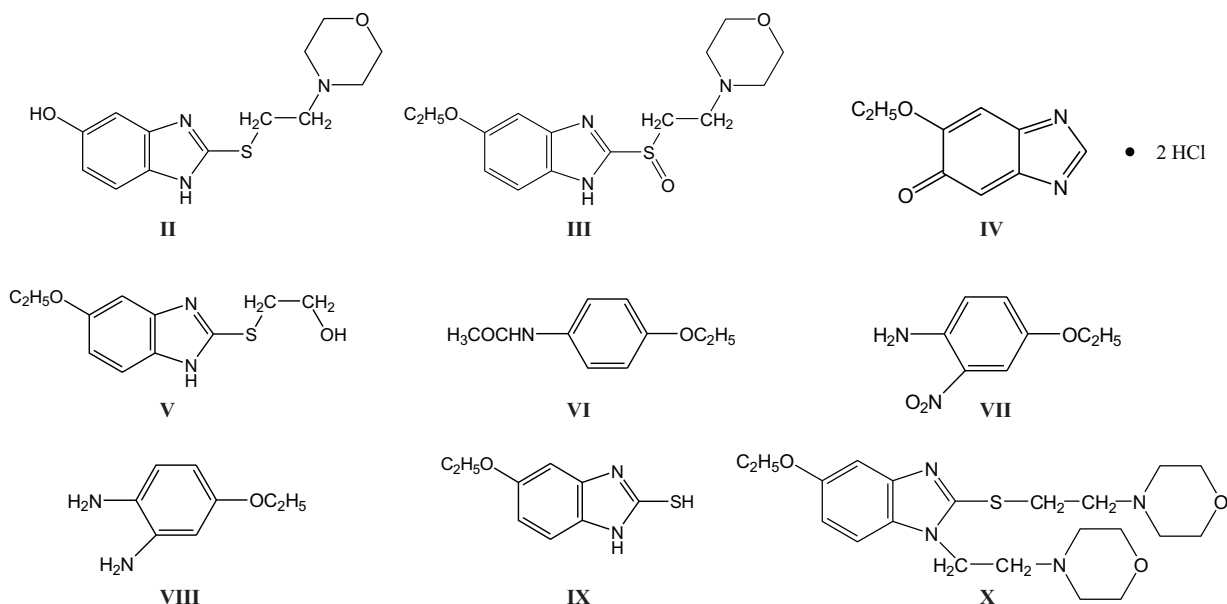


Рис. 2. Вероятные продукты гидролиза и окисления и полупродукты синтеза I

В некоторых образцах была обнаружена примесь 5-этокси-2-меркаптобензимидазола, содержание которой не превышало 0,2 %. Как и в субстанции, примеси полупродукта синтеза I — хлорэтилморфолина — в растворах для инъекций обнаружено не было. Сумма примесей в каждом образце не превышала 0,4 %.

Хроматографический анализ I методом ВЭЖХ был проведен в условиях, подобранных ранее для субстанции [3], на колонке длиной 150 мм и внутренним диаметром 4,0 мм, заполненной сорбентом C_{18} с размером частиц 7 мкм (“Диасфер-110- C_{18} ”). В качестве подвижной фазы использовали смесь элюэнтотв: метанол — вода pH 7,6 (1:1) (v/v), pH воды до 7,6 доводили с помощью 0,2 М раствора натрия гидроксида, режим элюирования изократический, скорость потока 1 мл/мин, аналитическая длина волны 302 нм, объем пробы 20 мкл.

В мерную колбу вместимостью 10 мл вносили 1 мл препарата, доводили объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивали (концентрация раствора 1 мг/мл). Полученные растворы хроматографировали, получая не менее 5 хроматограмм для каждого раствора.

В указанных выше условиях время I анализа составляло около 25 – 30 мин, ширина пика I на высоте от базовой линии в 5 % от общей высоты пика составляла около 3,0 – 3,5 мин, время удерживания составляло около 11 мин, эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику I, не превышала 1200 теоретических тарелок. В некоторых случаях происходило изменение формы пика афобазола, что мешало его количественному определению. Введение 0,02 М фосфатного буфера в состав подвижной фазы позволило получить более узкий пик I (ширина на высоте 5 % от базовой линии около 1 мин) и улучшить его форму, а кроме того, позволило снизить значение pH водного компонента фазы без значительного изменения времен удерживания I и технологических примесей.

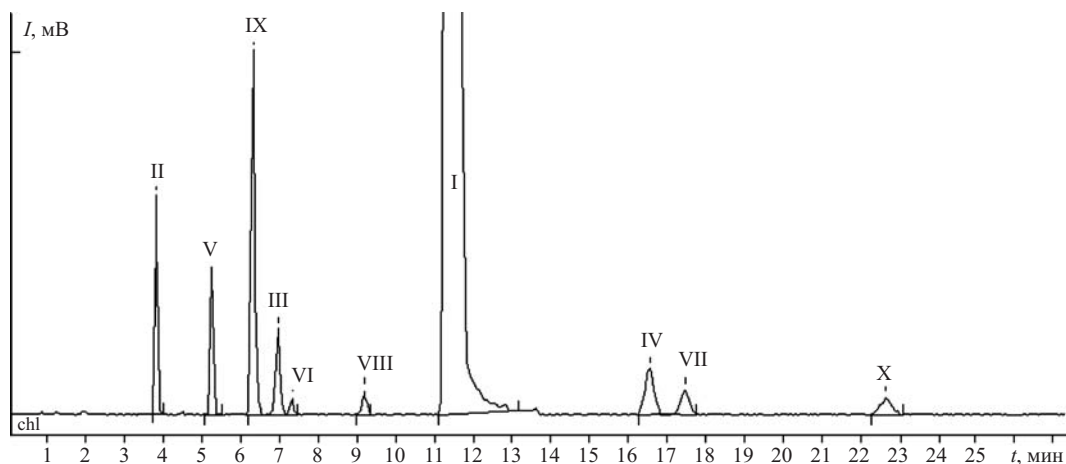


Рис. 3. Хроматограмма модельной смеси I и веществ-свидетелей

При анализе чистоты инъекционных растворов I с помощью разработанной методики были обнаружены примеси, отсутствовавшие в образцах субстанции, из которых были получены растворы: примесь 5-этоксид-2-меркаптобензимидазола и от 1 до 4 неидентифицированных примесей.

Нами было сделано предположение, что обнаруженные примеси являются продуктами окисления I, и предприняты попытки их идентифицировать. Для этого были синтезированы несколько вероятных продуктов гидролиза и окисления I — 5-гидрокси-2-[2-(морфолино)этилтио]бензимидазол (II), сульфоксид I (III), 5-этоксид-6-кетобензимидазола дигидрохлорид (IV) и 5-этоксид-2-[2-(гидрокси)этилтио]бензимидазол (V) (рис. 2). Полученные соединения были использованы в качестве свидетелей при хроматографическом анализе инъекционных растворов I.

Таким образом, в качестве свидетелей в нашем распоряжении были полупродукты синтеза I (фенацетин (VI), 3-нитро-4-аминофенетол (VII), 3,4-диаминофенетол (VIII), 5-этоксид-2-меркаптобензимидазол (IX), а также вероятный побочный продукт синтеза — 5-этоксид-1(3)-(2-морфолиноэтил)-2-[2-(морфолино)этилтио]-

бензимидазол (X)) и вероятные продукты гидролиза и окисления I (II, III, IV и V) (см. рис. 2).

Однако в процессе исследований было показано, что в системе метанол — 0,02 М фосфатный буфер (pH 7,3), 1:1, полного разделения всех свидетелей (полупродуктов синтеза и вероятных продуктов гидролиза и окисления I) не происходит. Изменением соотношения органического и водного компонента подвижной фазы и pH водного компонента лучших результатов добиться не удалось.

Полное разделение всех свидетелей и I было получено после введения в состав подвижной фазы ацетонитрила, на колонке длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненной сорбентом C₁₈ с размером частиц 5 мкм (Luna C₁₈(2)). Оптимальные результаты наблюдались в подвижной фазе ацетонитрил — метанол — 0,02 М фосфатный буфер (pH 7,3) 100:100:240 (v/v/v). С помощью УФ-спектрофотометрии было подтверждено, что в указанной фазе положение максимума I, при котором было предложено проводить де-

Таблица 1
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, мкг (302 нм)	R _s соседних пар
II	3,81 ± 0,08	0,33 ± 0,005	0,0020	—
V	5,23 ± 0,10	0,45 ± 0,008	0,0040	4,73
IX	6,32 ± 0,10	0,55 ± 0,007	0,0015	3,11
III	7,01 ± 0,11	0,61 ± 0,008	0,0020	1,73
VI	7,30 ± 0,07	0,63 ± 0,008	0,0300	1,11
VIII	9,20 ± 0,06	0,81 ± 0,010	0,0120	7,62
I	11,51 ± 0,23	1,000	0,0030	1,93
IV	16,62 ± 0,12	1,45 ± 0,010	0,0035	3,01
VII	17,53 ± 0,10	1,53 ± 0,012	0,0070	1,33
X	22,55 ± 0,10	1,98 ± 0,007	0,0035	6,69

Таблица 2
Результаты количественного определения модельных растворов I методом УФ-спектрофотометрии

№ модельного раствора	Введено в % к концентрации раствора сравнения (X _i , %)	Найдено в % к концентрации раствора сравнения (Y _i , %)	Найдено в % к введенному Z _i = 100 · (Y _i /X _i), %	
1	80,25	80,13	99,85	
2	85,66	85,63	99,96	
3	90,89	91,12	100,25	
4	94,95	94,59	99,62	
5	101,01	100,97	99,96	
6	105,32	105,73	100,39	
7	109,74	110,03	100,26	
8	115,14	114,96	99,84	
9	120,37	120,96	100,49	
Среднее Z, %			100,07	
Стандартное отклонение S _Z , %			0,29	
Параметры линейной зависимости y = bx + a				
a	S _a	b	S _b	r
-1,037	3,4	1,011	0,034	0,999

тектирование, практически не изменяется и составляет 302 нм.

Хроматограмма модельной смеси I и веществ-свидетелей в содержании около 0,5 % от содержания I представлена на рис. 3.

Времена удерживания, пределы обнаружения при 302 нм и параметры разделения I и веществ-свидетелей представлены в табл. 1.

На основании полученных результатов методика определения посторонних примесей была модифицирована следующим образом: хроматографирование проводится на колонке C_{18} , $250 \times 4,6$ мм (5 мкм) или аналогичной, в подвижной фазе ацетонитрил — метанол — 0,02 М фосфатный буфер (рН 7,3), 100:100:240, скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин, режим элюирования изократический, температура колонки комнатная, длина волны детектирования 302 нм, концентрация испытуемого раствора 1 мг/мл, объем пробы 20 мкл.

1 мл раствора I для инъекций помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора до метки подвижной фазой, перемешивают. Полученный раствор хроматографируют, получая не менее 5 хроматограмм для каждого раствора.

Содержание единичной примеси в препарате оценивают методом внешнего стандарта (стандарт — раствор рабочего стандартного образца I в подвижной фазе с концентрацией 0,005 мг/мл).

Для проверки пригодности хроматографической системы готовят раствор 0,005 г I и 0,005 г 5-этоксид-2-меркаптобензимидазола в 100 мл подвижной фазы. Пригодность хроматографической системы оценивают по эффективности хроматографической колонки (не менее 4000 теоретических тарелок), коэффициенту асимметрии пика I (не более 1,5), коэффициенту разделения пиков I и 5-этоксид-2-меркаптобензимидазола (не менее 6) и относительному стандартному отклонению, рассчитанному для площадей пиков I в 5 параллельных измерениях (не более 2 %).

Анализ серийных образцов инъекционного раствора I показал наличие в образцах до 5 примесей с относительными временами удерживания около 0,27; 0,33; 0,45; 0,55 и 0,72. Относительные времена удерживания 3 из обнаруженных примесей совпадали со временами удерживания полупродукта синтеза I — IX (0,55), а также II (0,33) и V (0,45) — 2 из вероятных продук-

тов гидролиза и окисления I. С помощью внесения добавок к пробам веществ-свидетелей, а также при хроматографировании проб в измененных условиях (измененное соотношение компонентов подвижной фазы) было показано, что, скорее всего, примеси в растворах и эти соединения идентичны. Примеси с относительными временами удерживания 0,27 и 0,72 идентифицировать не удалось.

Содержание каждой из обнаруженных примесей, определенное методом внешнего стандарта, не превышало 0,2 %, а их суммарное содержание не превышало 0,7 %.

Количественное определение I в инъекционных растворах проводили с помощью методов УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ по модифицированной методике.

Разработка методики УФ-спектрофотометрического определения количественного содержания I в растворах была проведена на модельных растворах, в качестве растворителя для проб использовали 0,01 М раствор хлористоводородной кислоты. Рабочая длина волны соответствовала максимуму УФ-спектра I и составляла 302 нм, измерение проводили в кювете с толщиной слоя 10 мм.

При концентрации испытуемых растворов I от 0,001 до 0,03 мг/мл наблюдалась прямолинейная зависимость оптической плотности от концентрации растворов, значение коэффициента корреляции составляло +0,998. На основании полученных результатов была выбрана рабочая концентрация 0,015 мг/мл (оптическая плотность около 0,620).

В указанных выше условиях был проведен количественный анализ модельных растворов I с концентрацией $10 \text{ мг/мл} \pm 20 \%$ и серийных образцов инъекционной лекарственной формы с концентрацией 10 мг/мл. До рабочей концентрации инъекционный раствор I разбавляли 0,01 М хлористоводородной кис-

Таблица 3
Результаты количественного определения серийных образцов инъекционного раствора I методом УФ-спектрофотометрии

Номер серии	Количественное содержание, мг/мл	Метрологические характеристики ($P = 95 \%$, $n = 5$)		
		S	$\Delta \bar{X}$	$\bar{\varepsilon}$, %
1	10,53	0,072	0,090	0,85
2	9,94	0,049	0,061	0,61
3	10,31	0,053	0,066	0,64
4	9,83	0,091	0,113	1,15
5	10,12	0,038	0,047	0,46

Таблица 4
Результаты количественного определения модельных растворов I методом ВЭЖХ

№ модельного раствора	Введено в % к концентрации раствора сравнения (ε , %)	Найдено в % к концентрации раствора сравнения (Y_i , %)	Найдено в % к введенному $Z_i = 100 \cdot (Y_i/X_i)$, %	
1	118,23	119,24	100,85	
2	113,3	113,22	99,93	
3	108,37	108,93	100,52	
4	103,45	103,94	100,47	
5	98,52	98,61	100,09	
6	93,6	93,84	100,26	
7	88,67	89,19	100,59	
8	83,74	83,68	99,93	
9	78,82	78,26	99,29	
			Среднее Z , %	
			100,21	
			Стандартное отклонение S_{z^2} , %	
			0,47	
Параметры линейной зависимости $y = bx + a$				
a	S_a	b	S_b	r
-1,938	4,56	1,022	0,046	0,999

Таблица 5
Результаты количественного определения серийных образцов инъекционного раствора I методом ВЭЖХ

Номер серии	Количественное содержание, мг/мл	Метрологические характеристики ($P = 95 \%$, $n = 5$)		
		S	$\Delta\bar{X}$	\bar{e} , %
1	10,53	0,101	0,125	1,19
2	9,78	0,053	0,062	0,64
3	10,13	0,134	0,167	1,64
4	9,77	0,084	0,104	1,09
5	10,08	0,050	0,061	0,62

лотой, навески РСО растворяли в 0,01 М хлористоводородной кислоте. Результаты анализа модельных растворов представлены в табл. 2.

Количественное содержание I в серийных образцах инъекционного раствора, определенное методом УФ-спектрофотометрии, составляло от 9,76 до 10,48 мг/мл, ошибка определения не превышала 1,2 % (см. табл. 3).

В рамках разработки методики количественного определения раствора I для инъекций методом ВЭЖХ была изучена зависимость отклика детектора (площади пика) от концентрации растворов. Прямолинейная зависимость наблюдалась в интервале концентраций от 0,0004 до 0,4 мг/мл (коэффициент корреляции 0,999) и была подтверждена в пределах интервала концентраций от 0,0064 до 0,0096 мг/мл (0,008 мг/мл \pm 20 %), коэффициент корреляции составлял 0,999, рабочая концентрация 0,008 мг/мл. Результаты анализа модельных растворов представлены в табл. 4.

Для количественного определения и идентификации I в инъекционной лекарственной форме испытуемые растворы готовили следующим образом: 1 мл препарата вносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивали. Полученный раствор (1 мл)

помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили подвижной фазой до метки и перемешивали.

Полученные растворы хроматографировали в условиях определения посторонних примесей. Количественное содержание I в инъекционной лекарственной форме определяли методом внешнего стандарта путем сравнения площадей пиков испытуемых образцов с площадью пика рабочего стандартного образца I (концентрация 0,008 мг/мл).

С помощью разработанной методики было определено количественное содержание I в серийных растворах, оно составило от 9,77 до 10,53 мг/мл, ошибка определения не превышала 1,7 % (см. табл. 5).

По результатам проведенных исследований было предложено определять подлинность раствора I для инъекций с помощью методов УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ по соответствию максимумов спектров и времен удерживания испытуемого раствора и раствора РСО. Для определения чистоты инъекционного раствора I возможно использование и методики ТСХ, и ВЭЖХ, однако предпочтение было нами отдано методу ВЭЖХ, как универсальному, позволяющему проводить определение подлинности, чистоты и количественного содержания в одних и тех же условиях эксперимента. Методика УФ-спектрофотометрии при определении количественного содержания в растворе I дает более точные результаты, чем ВЭЖХ, однако в силу указанных выше причин для количественного определения было предложено использовать метод ВЭЖХ.

ЛИТЕРАТУРА

1. С. Б. Середенин, Ю. А. Бледнов, В. Л. Савельев и др. Патент РФ 2061686; *Бюл. изобрет.*, № 16 (1996).
2. И. П. Галаева, Т. Л. Гарибова, Т. А. Воронина, С. Б. Середенин, *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **140**(11), 545 – 548 (2005).
3. С. Е. Милкина, О. Б. Степаненко, Л. Н. Грушевская и др., *Хим.-фарм. журн.*, **40**(7), 55 – 56 (2006).

Поступила 09.04.09

DEVELOPING METHODS FOR ANALYSIS OF AFOBAZOLE IN INJECTION FORMS

L. N. Grushevskaya¹, N. I. Avdyunina¹, S. E. Milkina², O. B. Stepanenko¹, B. M. Pyatin¹, K. V. Alekseev¹, and S. A. Sizyakov¹

¹ Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

² Institute for Drug Standardization, State Scientific Center for Drug Expertise and Control, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

This investigation was aimed at elaborating procedures for the pharmaceutical analysis of the parenteral dosage form of afobazole, a novel domestic drug with anxiolytic and neuroprotective action. The physicochemical properties of afobazole parenteral dosage form have been studied, methods for the determination of impurities (TLC, HPLC), and the drug identification and assay (UV spectrophotometry, HPLC) have been developed.

Key words: Afobazole, parenteral dosage form, pharmaceutical analysis, thin-layer chromatography, high performance liquid chromatography