

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОСТОРОННИХ ПРИМЕСЕЙ В ТАБЛЕТКАХ НОВОГО СОЕДИНЕНИЯ — АГОНИСТА КАППА-ОПИОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ РУ 1205

А. А. Илларионов, Л. Н. Грушевская, Л. М. Гаевая, Н. И. Авдюнина, Б. М. Пятин, К. В. Алексеев, И. В. Богунова

НИИ фармакологии имени В. В. Закусова, Москва

Разработана методика определения посторонних примесей в таблетках РУ 1205 с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Определены валидационные характеристики: линейность, диапазон применения, пределы обнаружения и количественного определения примесей, правильность и сходимость. Установлены критерии пригодности хроматографической системы. Определено содержание посторонних примесей в серийных образцах таблеток РУ 1205.

Ключевые слова: РУ 1205, таблетки, фармацевтический анализ, валидация, методика анализа, высокоэффективная жидкостная хроматография, ВЭЖХ, посторонние примеси.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF IMPURITY DETERMINATION TECHNIQUE IN TABLETS OF RU 1205, A NOVEL KAPPA OPIOID AGONIST

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

We developed a new technique for impurity determination in RU 1205 tablets using HPLC. We identified such validation characteristics as linearity, range of application, limits of detection and quantitative determination of impurities, convergence and correctness. We established suitability criteria for chromatography methods. We measured impurities in RU 1205 serial tablet samples.

Key words: RU 1205, tablets, pharmaceutical analysis, validation, analysis technique, high-performance liquid chromatography, HPLC, impurities.

В настоящее время в области разработки эффективных обезболивающих препаратов одним из перспективных направлений является поиск новых анальгетиков с каппа-опиоидной агонистической активностью, не обладающих наркотическим потенциалом [5]. Такими свойствами обладает новое отечественное соединение РУ 1205 (I), являющееся производным ряда 2,9-дизамещенных имидазо[1,2-а]бензимидазолов [4, 5]. При определении его анальгетических свойств было установлено, что величина обезболивающей активности ED₅₀ соединения I на центральной модели анальгезии, определяющей супраспинальный уровень болевой чувствительности, превосходит буторфанол в 6 раз [6].

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

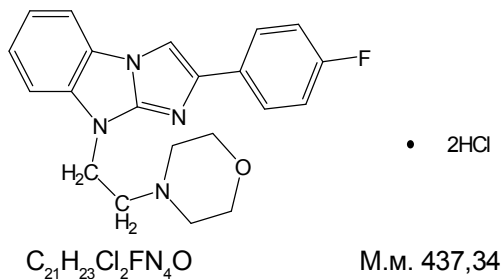


Рис. 1. Структурная формула I

В опытно-технологическом отделе ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В. В. Закусова» была разработана твердая дозированная лекарственная форма I — таблетки, покрытые оболочкой (заявка на выдачу патента № 2013144038), проведены исследования по разработке методики ее анализа и, в том числе, методики определения посторонних примесей с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в изократическом режиме [2]. Однако при дальнейших исследованиях было показано, что разработанная методика не позволяет полностью разделить пики извлечения из плацебо и пик одной из технологических примесей I, из-за чего ошибка определения этой примеси возрастает.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Разработать методики определения посторонних примесей с помощью ВЭЖХ, которая могла бы позволить провести идентификацию и количественную оценку содержания известных технологических примесей в таблетках I.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная часть. Исследования проведены на серийных образцах таблеток I 10 мг, покрытых оболочкой, разработанных в лаборатории готовых лекарственных форм опытно-технологического отдела ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В. В. Закусова». Теоретическая масса таблетки — 0,210 г.

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 ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В. В. Закусова», 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 ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В. В. Закусова», свидетель примеси IV предоставлен ЗАО «ЭМПИЛС-ФОХ», (Ростов-на Дону, Россия).

Хроматографический анализ проведен на жидкостном хроматографе Golden System (Beckman Coulter, Inc, США) с градиентным насосом (модель 127) и спектрофотометрическим детектором (модель 166), программное обеспечение — пакет «Мультихром 1.5» (ЗАО Амперсенд, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разделения I и свидетелей его технологических примесей, а также компонентов плацебо проведены в градиентном режиме элюирования.

Хроматографические условия: стальная колонка длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, сорбент — Hypersil BDS C18, 5 мкм (Thermo scientific), скорость потока подвижной фазы — 1,0 мл/мин, температура колонки — комнатная, объем пробы — 20 мкл.

Буферный раствор: раствор 3,48 г калия фосфорнокислого двузамещенного трехводного в 1000 мл воды для градиентной ВЭЖХ. pH раствора довели до $7,0 \pm 0,5$ кислотой фосфорной концентрированной.

Подвижная фаза А: смесь 10 мл ацетонитрила для градиентной ВЭЖХ и 110 мл буферного раствора. Подвижная фаза В: смесь 80 мл ацетонитрила для градиентной ВЭЖХ и 40 мл буферного раствора. Подвижные фазы А и Б фильтровали через вакуумную систему фильтрации Bottle-top Vacuum Filter (Corning) с диаметром пор 0,22 мкм и дегазировали.

В таблице 1 представлена схема градиента.

Таблица 1

Схема смены растворителей при градиентном анализе таблеток I

Время, мин	Стадия	Фаза А, %	Фаза Б, %
0	Начало анализа	100	0
4	Начало градиента	100	0
7	Конец градиента	0	100
20	Конец анализа	0	100

I и его примеси из таблеток и модельных смесей извлекали смесью метанола для ВЭЖХ и воды для градиентной ВЭЖХ (1 : 1).

Аналитическая длина волны, 275 нм соответствовала области совпадения максимумов поглощения примесей и I [3].

В указанных условиях происходило полное разделение I и технологических примесей (рис. 2). Извлечение из плацебо, приготовленное аналогично испытуемому раствору, определению посторонних примесей и I в таблетках I не мешало (рис. 3).

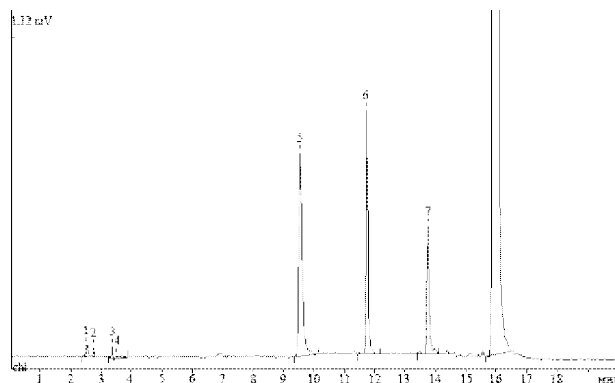


Рис. 2. Типичная хроматограмма модельной смеси технологических примесей и I: 1—4 пики плацебо, 5, 6, 7 — пики примесей II, III и IV соответственно в концентрации 0,01 мг/мл, 8 — пик I в концентрации 1 мг/мл

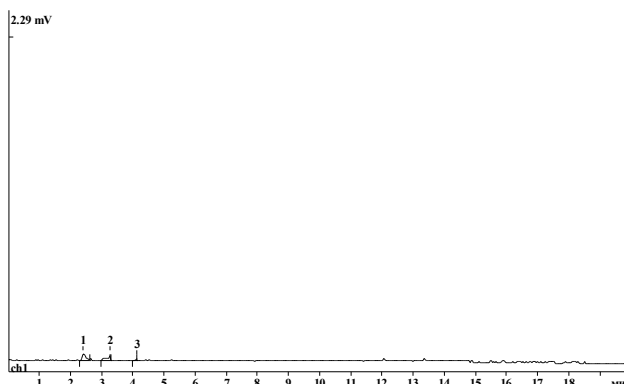


Рис. 3. Хроматограмма извлечения из плацебо

Линейная зависимость площади пика от концентрации I подтверждена в пределах интервала от 0,001 до 0,1 мг/мл, примесей II, III и IV — от 0,005 до 0,06 мг/мл, коэффициенты корреляции более 0,998 (рис. 4).

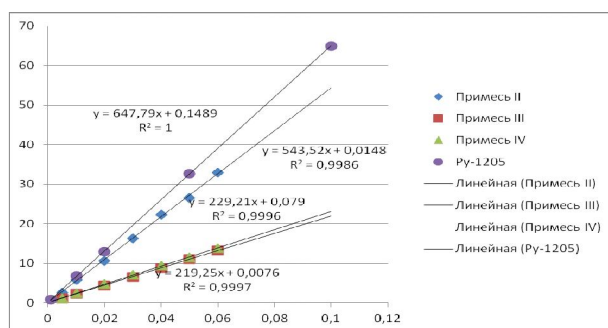


Рис. 4. Зависимость площади пика от концентрации I и технологических примесей

Предел обнаружения I составил около 0,002 мкг, примеси II — около 0,01 мкг, примеси III — около 0,01 мкг, примеси IV — около 0,014 мкг.

Предел количественного определения I составил — 0,0066 мкг, примеси II — 0,033 мкг, примеси III — 0,033 мкг, примеси IV — 0,0462 мкг.

Оценка правильности и сходимости методики была проведена на модельных смесях технологических примесей и плацебо.

Около 0,020 г (точная навеска) субстанций технологических примесей помещали в мерную колбу вместимостью 20 мл и добавляли 0,4 г плацебо. В колбу прибавляли около 18 мл смеси метанол для ВЭЖХ — вода для градиентной ВЭЖХ (1:1) и помещали на ультразвуковую ванну на 15 мин. Затем содержимое колбы доводили до метки тем же растворителем, тщательно перемешивали и фильтровали через фильтр «Миллипор» с диаметром пор 0,45 мкм. 1 мл полученного раствора переносили в колбу вместимостью 100 мл, доводили до метки, перемешивали.

Количественное определение примесей было проведено с применением поправочных коэффициентов, рассчитанных по формуле:

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

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

Поправочные коэффициенты составили 1,031 для примеси II, 2,248 для примеси III и 2,426 для IV примеси.

Сходимость методики оценивали, используя расчетные критерии, представленные в «Валидации аналитических методик для производителей лекарств» под ред. В. В. Береговых: средние значения измерений

($X_{ср}$), стандартные отклонения (S), коэффициенты вариации (RSD) и доверительные интервалы (ΔX) [5].

Результаты определения правильности и сходимости методики на модельных смесях также представлены в таблице 2.

Как видно из таблицы, доверительный диапазон среднего значения для примесей II и IV включает значение 100 %, значения вычисленного коэффициента Стьюдента ($t_{выч.}$) не превышают табличные ($t_{табл.}$), а следовательно, полученные результаты не отягощены систематической ошибкой и свидетельствуют об удовлетворительной правильности определения примесей II и IV с помощью разработанной методики. Присутствие систематической ошибки (δ) в случае определения примеси III, по-видимому, объясняется ее неполным извлечением из модельной смеси с плацебо. Однако величина этой ошибки невелика и не превышает 3,5 %.

О сходимости методики позволяют судить значения доверительного интервала (ΔX , для всех примесей не превышают 2,7 %), а также значения коэффициента вариации (RSD, для всех примесей не превышают 3,5 %). Значения коэффициента вариации не превышают 5 %, что является приемлемым для определения примесей [3, 7].

С применением разработанных условий был определенное содержание посторонних примесей в серийных образцах таблеток РУ 1205.

Приготовление испытуемых растворов для определения содержания примесей в образцах таблеток проводили следующим образом: около 0,420 г (точная навеска) массы растертых таблеток I переносили в мерную колбу вместимостью 20 мл, прибавляли около 18 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 (испытуемый раствор, концентрация I — 1 мг/мл).

Таблица 2

Результаты определения содержания технологических примесей в модельных смесях

Примесь II		Примесь III		Примесь IV	
взято (С1), мг/мл	найдено (в % от С1)	взято (С1), мг/мл	найдено (в % от С1)	взято (С1), мг/мл	найдено (в % от С1)
0,01500	100,99	0,01490	95,91	0,01500	102,94
	101,00		93,87		99,00
	100,99		98,97		104,9
0,01000	95,00	0,00995	93,46	0,01000	95,97
	96,53		96,48		95,00
	97,00		97,48		102,00
0,00505	100,66	0,00490	98,32	0,00510	102,33
	102,66		96,97		100,00
	104,33		98,32		103,33
Метрологические характеристики (P = 95 %, n = 9)					
$X_{ср.} \pm \Delta X = 99,91 \pm 2,42$ (%) S = 3,07; RSD = 3,07 % $\varepsilon = 2,42$ % $t_{выч.} = 0,09$; $t_{табл.} = 2,36$		$X_{ср.} \pm \Delta X = 96,64 \pm 1,47$ (%) S = 1,94; RSD = 2,00 % $\varepsilon = 1,52$ % $t_{выч.} = 5,20$; $t_{табл.} = 2,36$ $\delta = 3,36$		$X_{ср.} \pm \Delta X = 100,61 \pm 2,67$ (%) S = 3,39; RSD = 3,37 % $\varepsilon = 2,60$ % $t_{выч.} = 0,54$; $t_{табл.} = 2,36$	

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:

$$X = \frac{S_{пр} \times m_{ст} \times m_{ср} \times (W - Z_{ст}) \times 20}{S_{ст} \times m_{нав} \times C \times 20 \times 100 \times 100} \times 100 \% =$$

$$= \frac{S_{пр} \times m_{ст} \times m_{ср} \times (W - Z_{ст})}{S_{ст} \times m_{нав} \times C \times 100},$$

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

Для расчета содержания примеси III, использовался коэффициент 2,25.

Типичная хроматограмма извлечения из таблеток I, покрытых оболочкой, представлена на рис. 5.

В таблице 3 представлены результаты определения посторонних примесей в образцах таблеток I. В образцах таблеток была обнаружена примесь III, с относительным временем удерживания $0,73 \pm 0,3$, содержание которой не превышало 0,3 %, а также другие примеси, идентифицировать которые не удалось. Содержание единичной примеси во всех образцах не превышало 0,35 %, а сумма примесей — 0,9 %.

Для проверки пригодности хроматографической системы готовили раствор РСО I и примеси II с концентрацией каждого соединения 0,01 мг/мл.

Оценку пригодности хроматографической системы проводили следующие критерии: относительное стандартное отклонение результатов отдельных измерений площадью пика I (RSD), число теоретических тарелок (N), коэффициент асимметрии пика I (Q) и относительное время удерживания примеси II (относительно времени удерживания I) в растворе для проверки пригодности хроматографической системы (t отн.). Результаты представлены в таблице 4.

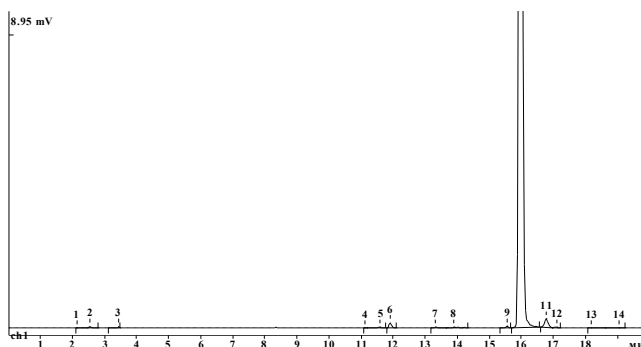


Рис. 5. Типичная хроматограмма извлечения из таблеток I покрытых оболочкой серии 20213:

- 1, 2 и 3 — пики плацебо;
- 10 — пик I в концентрации 1 мг/мл,
- 6 — пик примеси III;
- 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14 — неидентифицированные примеси

Таблица 3

Результаты определения посторонних примесей в таблетках РУ 1205

Относительное время удерживания	Содержание посторонних примесей, %				
	20213	30213	40213	50213	60213
0,378	—	—	0,0337	0,0257	—
0,411	—	—	—	—	0,0393
0,688	0,0076	0,0107	—	0,0136	—
0,730 Примесь III	0,2951	0,2691	0,2689	0,2114	0,1767
0,831	0,0213	0,0184	0,0015	0,0181	0,0166
0,871	0,0580	0,0552	0,0199	0,0303	0,2631
0,971	0,0641	0,0537	0,0383	0,0333	0,0377
1,050	0,3144	0,3208	0,2960	0,2897	0,2933
1,070	0,0351	0,0215	0,0245	0,0166	0,0438
1,145	0,0351	0,0307	0,0245	0,0227	0,0226
1,200	0,0259	0,0184	0,0184	0,0136	—
Сумма примесей, %	0,8566	0,7985	0,7257	0,6569	0,8931

Таблица 4

Параметры и критерии пригодности хроматографической системы

Результаты определения параметров пригодности хроматографической системы (среднее ± доверительный интервал)			
N	Q	t отн.	RSD
27702 ± 183	1,16 ± 0,03	0,5940 ± 0,0057	1,55 ± 0,20 %
Критерии приемлемости			
не менее 25000	не более 1,2	0,59 ± 0,01	не более 2 %

Согласно полученным данным были установлены следующие критерии пригодности хроматографической системы: число теоретических тарелок — не менее 25000; коэффициент асимметрии пика I — не более 1,2; относительное время удерживания примеси II — $0,59 \pm 0,01$ и относительное стандартное отклонение результатов отдельных измерений площадей пика I — не более 2 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований была разработана методика определения посторонних примесей в серийных образцах таблеток I методом градиентной ВЭЖХ, позволяющая полностью разделить I, II, III, IV, а также другие неидентифицированные примеси и компоненты плацебо.

Определены валидационные характеристики методики: линейность и диапазон применения, пределы обнаружения и количественного определения примесей. Установлены критерии пригодности хроматографической системы. На модельных смесях технологических примесей и плацебо показано, что методика обладает приемлемой правильностью и сходимостью.

С помощью разработанной методики был проведен анализ серийных образцов таблеток I, который показал присутствие в образцах примеси III в содержании, не превышающем 0,3 %. Также в образцах были обнаружены другие примеси, идентифицировать которые не удалось. Содержание индивидуальной примеси не превышало 0,35 %, а суммарное содержание примесей — 0,9 %.

ЛИТЕРАТУРА

1. Валидация аналитических методик для производителей лекарств: типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств / Под ред. В. В. Береговых — М.: Литерра, 2008. — 132 с.
2. Илларионов А. А., Грушевская Л. Н., Гаевая Л. М. // Хим.-фарм. журн. — 2014. — Т. 48, № 5. — С. 97—102.
3. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / Под ред. Н. В. Юргеля, А. Л. Младенцева — М. 2007. — С. 32
4. Спасов А. А., Анисимова В. А., Васильев П. М. и др. Средство, обладающее каппа-опиоидной агонистической активностью. Патент РФ 2413512 // Бюл. изобрет. — 2011. — № 7.
5. Спасов А. А., Гречко О. Ю., Васильев П. М., Анисимова В. А. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. — 2011. — № 8. — С. 52—55.
6. Спасов А. А., Гречко О. Ю., Штарева Д. М., Анисимова В. А. // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2013. — Т. 76, № 9. — С. 15—18.
7. Ghulam A. Shabir // Journal of Chromatography A. — 2003. — № 987. — С. 57—66.

Контактная информация

Илларионов Александр Анатольевич — аспирант опытно-технологического отдела ФГБУ «НИИ фармакологии имени В. В. Закусова» РАМН, e-mail: otopharm@mail.ru

УДК 617.3:615.477

ТЕРМИНОЛОГИЯ И КЛАССИФИКАЦИЯ ЭКСОСКЕЛЕТОВ

**А. А. Воробьев, Ф. А. Андрющенко, О. А. Засыпкина, И. О. Соловьева,
П. С. Кривоножкина, А. М. Поздняков**

*Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра оперативной хирургии и топографической анатомии, кафедра медицинской реабилитации
и спортивной медицины с курсом медицинской реабилитации, лечебной физкультуры,
спортивной медицины, физиотерапии ФУВ, Волгоградский медицинский научный центр*

В статье представлена разработанная классификация экзоскелетов, вносятся уточнения в терминологию данного понятия.

Ключевые слова: экзоскелет, классификация.

TERMINOLOGY AND CLASSIFICATION OF EXOSKELETON

**A. A. Vorobiev, F. A. Andrutshenko, O. A. Zasypkina, I. O. Solovieva,
P. S. Krivonozhkina, A. M. Pozdnykov**

The article presents a classification of exoskeleton. We make some improvements in relevant terms.

Key words: exoskeleton, classification.

Авторы данной публикации выражают уверенность, что в будущем экзоскелеты могут стать важной частью в жизни любого человека. Но сейчас технологии, связанные с их разработкой, только начинают раз-

виваться [2, 5—9], и как на любом начальном этапе пути встречается много разночтений и неопределенных аспектов, которые нам хотелось бы уточнить в данном исследовании.