

Определение примесей в субстанции дротаверина гидрохлорида методом ОФ ВЭЖХ

А.Ю. Куликов^{1,2}, А.П. Бойченко^{1,3}, О.С. Чернышёва¹

¹ Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, 61022, Украина, kulikov@phukr.kharkov.ua

² Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств ул. Астрономическая, 33, Харьков, 61085, Украина,

³ Университет Гренингена, A. Deusinglaan 1, 9713 AV, Гренинген, Нидерланды

Поступила: 23 апреля 2013 г / Принята к публикации: 9 июня 2013 г.

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии проведен анализ содержания родственных примесей в субстанциях дротаверина гидрохлорида по методикам контроля их качества согласно требованиям фирм-производителей субстанций и готовых лекарственных средств. Показано, что разные хроматографические методики дают разные результаты при контроле одной и той же серии субстанции дротаверина гидрохлорида. Сравнительный анализ на аномальную токсичность и содержание примесей не позволил выделить приемлемую методику контроля родственных примесей в исследуемых субстанциях.

A.Yu. KULIKOV, A.P. BOICHENKO, O.S. CHERNYSHEVA. DETERMINATION OF IMPURITIES IN DROTAVERINE HYDROCHLORIDE SUBSTANCE BY RP HPLC. – HPLC analysis of related impurities contents in Drotaverine hydrochloride substances was done by using various methods of quality control in accordance with the requirements of substances and drugs manufacturers. It is shown, that different chromatographic techniques give different results in the control of the same series of Drotaverine hydrochloride substance. Comparative study of the relationships between abnormal toxicity and total impurity contents are not allowed to chose an acceptable HPLC method for related impurities control in the investigated substances.

Ключевые слова: субстанция дротаверина гидрохлорид, родственные примеси, высокоэффективная жидкостная хроматография

Keywords: Drotaverine hydrochloride, related impurities, High Performance Liquid Chromatography, abnormal toxicity

Дротаверина гидрохлорид (1-(3,4-диэтоксипензилиден)-6,7-диэтокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин) – антиспазмолитическое лекарственное средство (патентованное название «Но-шпа»), был впервые синтезирован в Венгрии в 1961 году. По химической структуре и фармакологическим свойствам дротаверин близок к папаверину, но обладает более сильным и продолжительным действием, в меньшей степени обладает побочными действиями; уменьшает поступление Ca^{2+} в гладкомышечные клетки, снижает тонус гладких мышц внутренних органов и перистальтику кишечника, расширяет кровеносные сосуды.

Для количественной оценки содержания дротаверина гидрохлорида в лекарственных средствах используются методы спектрофотометрии [1-5], тонкослойной хроматографии [3], ВЭЖХ [6-8] и даже ионометрии с дротаверин-селективным мембранным электродом [9-11]. В настоящее время, в связи с увеличением требований к контролю качества лекарственных субстанций и готовых лекарственных средств (ГЛС), требуется

проводить не только количественное определение содержания основного действующего вещества, но и определение содержания примесей. Согласно фармакопеям примеси бывают технологические (получаются как побочные продукты при синтезе субстанции и чаще всего не накапливаются в ГЛС) и родственные, то есть являются продуктами разложения субстанции или ГЛС, возникающими при хранении.

Чаще всего определяют суммарное содержание примесей. Испытания такого рода достигают поставленной цели – оценки общей загрязненности образца. Однако наиболее токсичные примеси, которые могут встречаться в субстанции или ГЛС, контролируются и нормируются более жестко, и чаще всего для их определения используют метод ВЭЖХ.

Субстанция дротаверина гидрохлорид описана в Фармакопее Венгрии VII издания [12], где для контроля примесей в субстанции используют метод ТСХ. ГЛС, содержащие дротаверина гидрохлорид, в фармакопеях не описаны [12-17], и для их контроля фирмой-

производителем разрабатывается соответствующий нормативный документ; основным методом контроля примесей, указанным в нормативном документе, является ВЭЖХ. В результате оказалось, что было предложено несколько хроматографических условий (тип колонки, состав подвижной фазы, условия детектирования) для контроля содержания примесей как в субстанции, так и в готовых лекарственных средствах.

Целью данной работы является сравнение хроматографических методик определения содержания родственных примесей в субстанции дротаверина гидрохлорида и изучение взаимосвязи токсичность – содержание примесей. Полученные данные позволяют сделать вывод о методике, наиболее пригодной для контроля качества субстанции дротаверина гидрохлорида на содержание примесей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. В работе в качестве компонентов подвижных фаз использовали метанол, ацетонитрил, гидрофосфат аммония, ацетат натрия, ортофосфорную, уксусную и серную кислоту квалификации х.ч. Для приготовления растворов использовали свободную от карбонатов бидистиллированную воду.

В работе было исследовано десять субстанций дротаверина гидрохлорид различных фирм производителей (субстанции 1-10), а также три субстанции, в которых искусственным способом увеличено содержание примесей (субстанции 11-13).

Условия хроматографирования.

Методика № 1: колонка Nucleosil C8 (250×4 мм, 5 мкм); подвижная фаза: раствор 0.05 моль/л $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – ацетонитрил (1:1), доведенная до pH 5.2 концентрированной H_3PO_4 ; скорость подвижной фазы 2 мл/мин; длина волны детектирования 242 нм.

Методика № 2: колонка Hypersil BDS (150×4.6 мм, 5 мкм); подвижная фаза: раствор 13.2 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, доведенный до pH 3.3 концентрированной H_3PO_4 , – ацетонитрил – метанол (40:20:40 по об.); скорость подвижной фазы 1.0 мл/мин; длина волны детектирования 244 нм.

Методика № 3: колонка Nucleosil RP18 (250×4 мм, 5 мкм); подвижная фаза: метанол – ацетонитрил – раствор 10.88 г/л ацетата натрия и 30 мл/л кислоты уксусной ледяной (2:12:11 по об.); скорость подвижной фазы 1.0 мл/мин; длина волны детектирования 254 нм.

Методика № 4: колонка Spherisorb S3-CN (150×4.6 мм, 3 мкм); подвижная фаза: раствор 0.05 моль/л $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – ацетонитрил (1:1), доведенная до pH 5.2 концентрированной H_3PO_4 ; скорость подвижной фазы 1.2 мл/мин; длина волны детектирования 230 нм.

Методика № 5: колонка Suplecasil LC ABZ (250×4.0 мм, 5 мкм). Подвижная фаза А (ПФ А): ацетонитрил – 0.002 моль/л раствор H_2SO_4 (15:85). Подвижная фаза Б: ацетонитрил. Градиентное элюирование: 0-5 мин – 100% ПФ А; 5-35 мин 100→70% ПФ А; 35-45 мин – 70% ПФ А; 45-46 мин – 70→100% ПФ А; 46-55 мин – 100% ПФ А. Скорость подвижной фазы 1 мл/мин; длина волны детектирования 242 нм; температура колонки 40°C.

Методика № 6: колонка Purospher Star RP-18e (125×4.0 мм, 5 мкм); подвижная фаза: раствор 6.6 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, доведенный до pH 5.2 концентрированной H_3PO_4 – ацетонитрил – метанол (40:18.5:41.5 по об.); скорость подвижной фазы 1 мл/мин; длина волны детектирования 242 нм.

Аппаратура для хроматографических исследований

Хроматографические эксперименты проводили на жидкостном хроматографе фирмы Hewlett Packard (Agilent Technologies, Германия) модели 1050, состоящего из насоса, автосамплера, спектрофотометрического детектора с варьируемой длиной волны и интегратора серии 3395.

Значение pH подвижных фаз контролировали с помощью pH-метра Beckman Ф-200 pH meter (Beckman Instruments, Fullerton, CA, США).

Для взвешивания использовали весы аналитические AB204-S (Mettler Toledo, Германия) с точностью взвешивания ± 0.2 мг.

Программное обеспечение

Для расчетов в работе использовали Microsoft Excel (2002, Microsoft Corporation, <http://office.microsoft.com>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Хотя дротаверина гидрохлорид синтезирован давно и используется уже достаточно длительное время, в литературе практически нет данных по изучению его примесей и продуктов его метаболизма. Так как он является структурным аналогом папаверина гидрохлорида, то можно предположить, что его спирт и альдегид (схема 1) также будут иметь большую токсичность, как это было показано для папаверина гидрохлорида [18, 19]. Также возможно предположить, что примесями могут быть дезэтильные и дегидропроизводные дротаверина, которые могут образовываться при воздействии на субстанции дротаверина гидрохлорида, например, солнечного света и кислорода воздуха.

Отсутствие стандартных образцов примесей, надежного теста для проверки пригодности хроматографической системы и множество хроматографических методик для контроля содержания примесей не дает возможность оценить правильность методик определения

сопутствующих примесей дротаверина гидрохлорида хроматографическим методом.

Воспроизведение методик и определение содержания примесей в субстанции дротаверина гидрохлорида. Было проведено сравнение результатов определения примесей в субстанциях дротаверина гидрохлорида различных фирм-производителей методом ОФ ВЭЖХ по известным методикам. Вместо колонки Purospher Star RP-18e использовалась колонка Kromasil C18, которая по своим характеристикам аналогична вышеуказанной [20, 21]. Если в документации не была указана температура колонки, то разделение проводилось при температуре 30°C.

Было оценено количество примесей, которые можно определить в условиях

той или иной хроматографической методики, а также суммарное содержание примесей. Так как отсутствуют стандартные образцы примесей и неизвестен фактор отклика детектора к веществам при длине волны детектирования,

суммарное содержание примесей оценивали методом внутренней нормировки.

К сожалению, такой вариант оценки примесей дает приблизительные результаты. Кроме того, оценка суммарного содержания примесей осложняется еще и тем, что детектирование (в различных нормативных документах) проводят при различных длинах волн – 230, 242, 254 нм.

Кроме того, на определение примесей в субстанции может оказать влияние воспроизведение методики на аналогичной колонке, то есть колонке с тем же самым типом сорбента, но другой фирмы-производителя [13-17]. В таблице 1 приведены результаты определения числа примесей и их суммарного содержания в 10 образцах субстанций дротаверина гидрохлорида и в 3 образцах дротаверина гидрохлорида, которые были предварительно подвергнуты разложению. Хроматограммы, полученные при воспроизведении методик для одной из анализируемой серии субстанции дротаверина гидрохлорида, представлены на рис. 1.

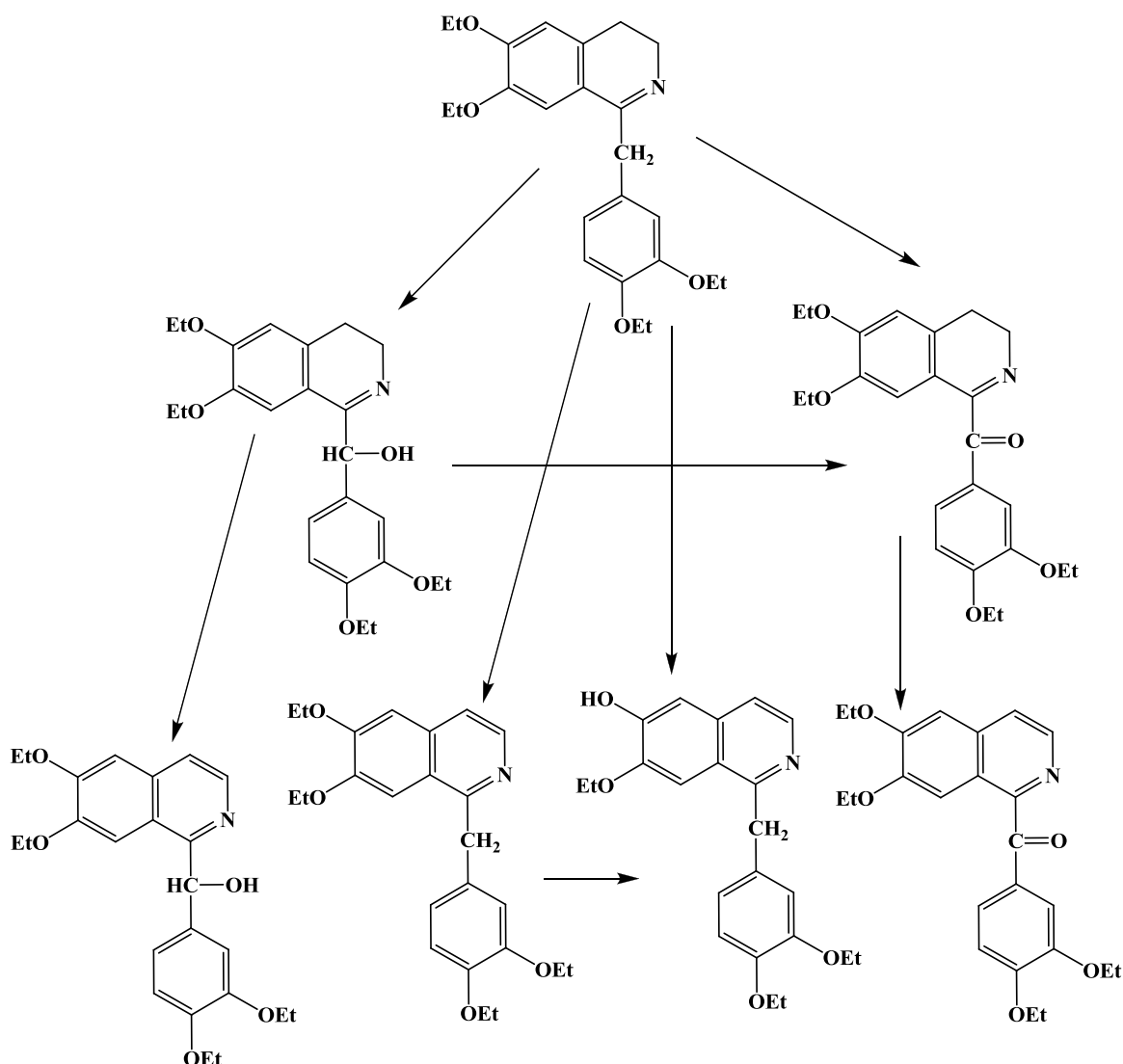


Схема 1. Возможная схема образования примесей дротаверина гидрохлорида.

Таблица 1. Результаты оценки примесного состава субстанций дротаверина гидрохлорида, полученные методом ВЭЖХ

№ образца	Kromasil C18		Supelcosil LC ABZ		Spherisorb CN		Nucleosil C18		Hypersil BDS	
	n ¹	m ²	n	m	n	m	n	m	n	m
1	8	4.9±0.2	7	5.2±0.1	5	4.2±0.1	6	4.4±0.3	1	0.10±0.05
2	4	0.4±0.1	8	2.2±0.4	3	0.4±0.1	3	0.4±0.1	1	0.10±0.05
3	4	0.7±0.2	6	1.8±0.4	3	0.6±0.1	-	-	1	0.7±0.1
4	6	0.8±0.4	6	1.6±0.1	4	2.1±0.3	4	0.6±0.1	2	1.2±0.4
5	3	0.5±0.1	17	1.2±0.2	11	0.26±0.05	-	-	-	-
7	3	0.4±0.1	3	1.4±0.4	7	0.28±0.05	3	0.3±0.1	1	0.14±0.04
8	-	-	7	1.7±0.1	3	0.6±0.1	2	0.5±0.1	0	0
10	7	1.2±0.2	16	1.8±0.3	6	1.4±0.2	3	1.2±0.1	3	1.05±0.05
11	20	22.7±0.5	27	26.9±0.4	12	13.0±0.4	11	23.8±0.3	5	9.2±0.5
12	9	7.1±0.4	27	9.0±0.5	8	1.9±0.1	10	5.2±0.2	3	0.9±0.2
13	5	0.7±0.1	6	1.6±0.3	6	0.7±0.1	4	0.6±0.1	2	2.8±0.3

¹ Число обнаруженных примесей. ² Общее содержание примесей в %.

Все методики, предлагаемые для контроля родственных примесей в субстанции дротаверина гидрохлорид методом ВЭЖХ, дают отличные друг от друга значения как общего содержания примесей, так и их числа.

При этом говорить о явных упущениях в условиях проведения анализа, руководствуясь любой из них, не представляется возможным. Можно сделать предположение, что наиболее приемлемой методикой для получения сведений об общем содержании примесей в субстанции является та, при помощи которой возможно определить максимальное количество примесей. Такой является методика 5 с использованием градиентного элюирования и колонки Supelcosil LC ABZ.

Такие противоречивые результаты анализов говорят о том, что ни одна из воспроизведенных методик не может дать правильных результатов оценки содержания примесей в субстанции дротаверина гидрохлорид. Как следствие, использование при контроле качества субстанций какой либо одной из них может привести к неверному заключению о пригодности субстанции для изготовления лекарственных форм.

Еще один вывод, который можно сделать на основании проведенного эксперимента – контролировать содержание примесей в субстанции дротаверина гидрохлорид нужно по методике той фирмы, которая синтезировала данную субстанцию. Это, в свою очередь, приводит к крайне неутешительному следствию: введение в фармакопею какого-либо метода ВЭЖХ для контроля содержания примесей в субстанции дротаверина гидрохлорида может привести к тому, что часть субстанций, в принципе удовлетворяющих требованиям аналитической нормативной документации фирм-

производителей по контролю их качества, могут быть отбракованы уполномоченными органами именно из-за результатов, которые будут получены при воспроизведении методики анализа. Это важно, так как в фармакопеях не указывается конкретное торговое название сорбента, наиболее пригодного для данного анализа, а ограничивается только указанием вида привитого углеводородного радикала.

Сравнение результатов определения примесей и токсичности субстанции. Для выбора адекватной методики оценки содержания примесей в субстанции дротаверина гидрохлорида были проведены параллельные исследования субстанций на аномальную токсичность и на содержание примесей. Определение аномальной токсичности проводилось фармакологической группой лаборатории фарманализа в соответствии с требованиями Европейской Фармакопеи [13]. Для этого 0.5 мл предварительно приготовленного раствора дротаверина гидрохлорида (0.43 мг дротаверина гидрохлорида в 1 мл раствора) вводили внутривенно 1 мышью в течение 15 с, и наблюдали за подопытной в течение 48 часов.

Вводимая мышью тест-доза является максимально переносимой дозой, т.е. такой дозой, при введении которой у мышей не отмечается клинических явлений интоксикации или наблюдаемые явления интоксикации проявляются кратковременно и очень слабо.

Проведенными испытаниями установлено, что все исследуемые образцы препарата формально выдерживают испытание на «аномальную токсичность» по количественному учету выживаемости мышей [13-17]. Однако в ходе испытания выявлено, что представленные образцы вызывают различные по выраженности клинические явления интоксикации (табл. 2).

Из полученных данных можно увидеть, что нет четкой корреляции между суммарным содержанием примесей в субстанции дротаверина гидрохлорида и токсичными явлениями.

Следовательно, у дротаверина гидрохлорида есть высокотоксичные примеси, которые следует идентифицировать и жестко контролировать в субстанции.

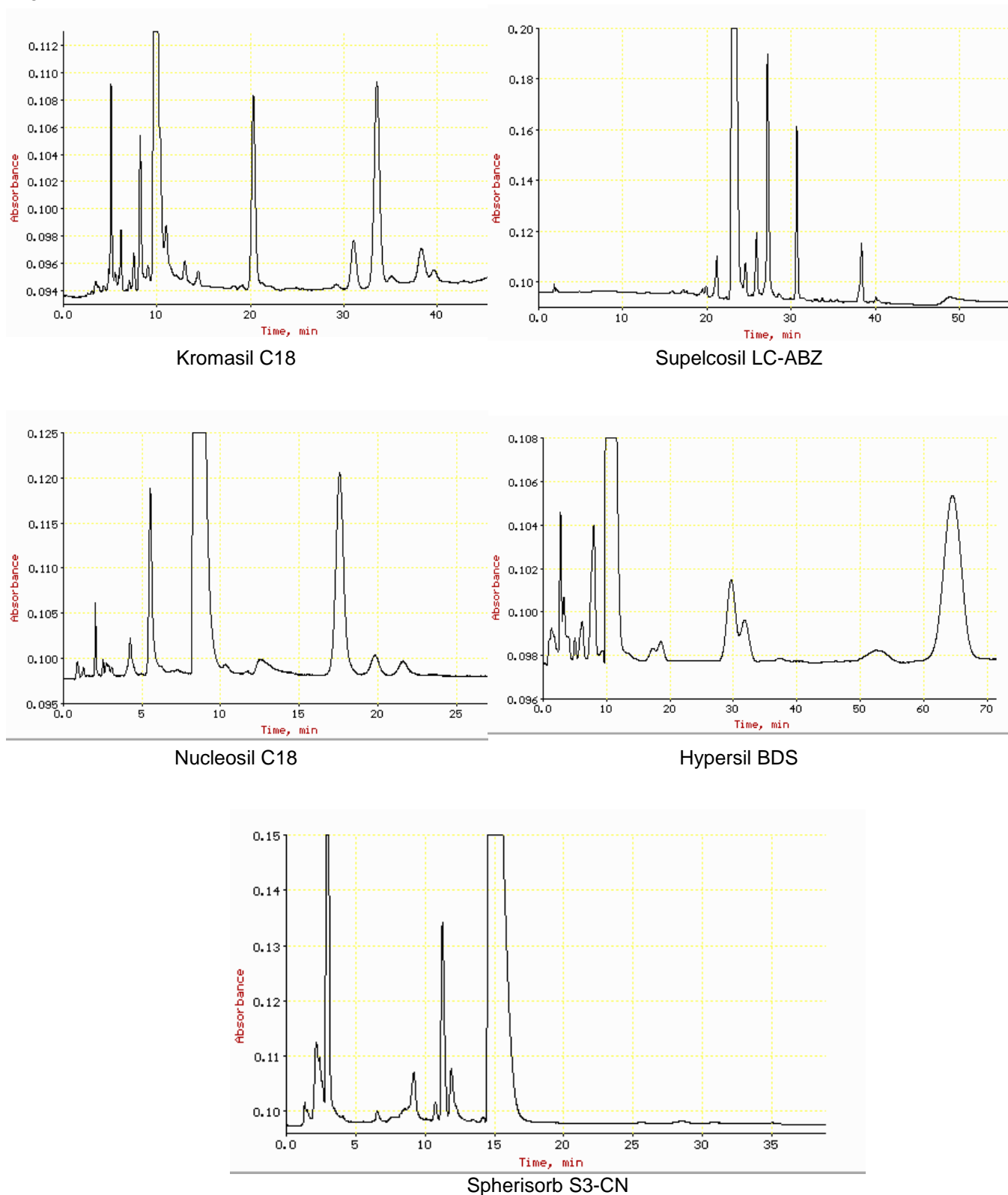


Рис. 1. Хроматограмма определения примесей в субстанции дротаверина гидрохлорида, полученная при воспроизведении хроматографических методик на соответствующих колонках для одной серии субстанции дротаверина гидрохлорида.

Таблица 2. Данные об общей доле примесей и результаты отчета исследований субстанций дротаверина гидрохлорид по показателю «аномальная токсичность»

Суммарное содержание примесей, %						Выявленные явления интоксикации.
№ образца	Kromasil C18	Supelcosil LC ABZ	Spherisorb CN	Nucleosil C8	Hypersil BDS	
5	0.50	1.19	0.26			Нарушения координации движений проявляются кратковременно (5-7 мин) и их выраженность является минимальной.
8		1.66	0.64	0.52		
10	1.21	1.75	1.35	1.22	1.05	Сразу после введения вызывает значительные по выраженности явления интоксикации в виде тремора конечностей, нарушения координации движений, непроизвольных сокращений мышц. Животные принимают полусидящее положение с расставленными задними лапами (тоническая поза).
3	0.72	1.81	0.62		0.65	К указанным явлениям при введении препарата 10 добавляются сильные клонические судороги у 2-х мышей (с массой тела 21 и 20 г).
2	0.35	2.15	0.43	0.38	0.10	Зарегистрированы судороги у 1 мыши (из 5-и) с массой тела 17 г. При повторении испытания на следующих 5 мышях выраженных явлений интоксикации не зарегистрировано.

ВЫВОДЫ

На основании сопоставления результатов оценки содержания примесей в субстанции дротаверина гидрохлорид по известным методикам нельзя рекомендовать ни одну из них как правильную для включения в Фармакопею с целью контроля качества вышеуказанной субстанции.

Данные испытаний на «аномальную токсичность» подтверждают наличие в субстанции дротаверина гидрохлорид высокотоксичных примесей, которые следует идентифицировать, регламентировать, и жестко контролировать их содержание.

ЛИТЕРАТУРА

1. Metwally F.H. Simultaneous determination of Nifuroxazide and Drotaverine hydrochloride in pharmaceutical preparations by bivariate and multivariate spectral analysis. *Spectrochim. Acta Part A*. 2008, 69, 343-349.
2. El-Wasseef D.R., El-Sherbiny D., Eid M., Belal F. Spectrofluorometric Determination of Drotaverine Hydrochloride in Pharmaceutical Preparations. *Analyt. Lett.* 2008, 41, 2354-2362.
3. Ayad M.M., Youssef N.F., Abdellatif H.E., Soliman S.M. A comparative study on various spectrometries with thin layer chromatography for simultaneous analysis of drotaverine and nifuroxazide in capsules. *Chem. Pharm. Bull.* 2006, 54, 807-813.
4. Amin A.S., El-Sheikh R., Zahran F., Abou El-fetouh Gouda A. Spectrophotometric determination of pipazethate HCl, dextromethorphan HBr and drotaverine HCl in their pharmaceutical preparations. *Spectrochim. Acta Part A*. 2007, 67, 1088-1093.
5. Abdellatef H.E., Ayad M.M., Soliman S.M., Youssef N.F. Spectrophotometric and spectrodensitometric determination of paracetamol and drotaverine HCl in combination. *Spectrochim. Acta Part A*. 2007, 66, 1147-1151.
6. Panigrahi D., Mishra G.P., Sharma R. Study of stressed degradation behavior of drotaverine and

development of a validated stability-indicating HPLC assay method *Der Pharma Chemica*. 2012, 4(3), 847-853.

7. Bolaji O.O., Onyeji C.O., Ogungbamila F.O., Ogunbona F.A. High performance liquid chromatographic method for the determination of drotaverine in human plasma and urine *J. Chromatography*. 1993, 622, 93-97.

8. Jain J.R., Shah D.R., Shah S.A., Chauhan R.S. RP-HPLC method for simultaneous estimation of Drotaverine hydrochloride and Aceclofenac in their combined tablet dosage form. *Der Pharma Chemica*. 2011, 3(4), 245-252.

9. El-Saharty Y.S., Metwaly F.H., Refaat M., El-Khateeb S.Z. Application of new membrane selective electrodes for the determination of drotaverine hydrochloride in tablets and plasma *J. Pharm. & Biomed. Analysis*. 2006, 41, 720-724.

10. Kharitonov S.V., Zarembo V.I. An ion-selective electrode for quantitative analysis of therapeutic formulations of no-shpa. *Pharm. Chem. J.* 2008, 42(5), 297-300.

11. Kharitonov S.V. Transport properties and electroanalytical response characteristics of drotaverine ion-selective sensors. *Anal. Bioanal. Chem.* 2005, 382, 1642-1651.

12. Pharmacopoea Hungarica. Akadémiai Kiadó. Budapest, 1970. 597 p.

13. European Pharmacopoeia 7th ed. / Council of Europe. – France: Strasbourg, 2011. 3310 p.

14. United States Pharmacopoeia 36th ed. / National Formulary 31th ed. / United State Pharmacopoeial Convention: Rockville, 2012. 4592 p.

15. German Homoeopathic Pharmacopoeia. 5th Supplement. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 1993.

16. Державна Фармакопея України. Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 1-ше вид. Харків: PIPEГ, 2001. 556 с.

17. Государственная Фармакопея Российской Федерации, 12-е изд. Научный центр экспертизы средств медицинского применения. 2008, 696 с.

18. Colautti A., Fontani F., Maurich V. HPLC determination of papaverdine and papaverinol in papaverine injection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1987, 5, N 5, 493-499.

19. Piotrowska K., Hermann T.W., Augustyniak W. Kinetics of photooxidation of papaverine hydrochloride and its major photooxidation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, 41, 1391–1395.

20. ChromBook. Merck, 2004. 187 p.

21. Chromatography. Products for analysis and purification. Supelco, 2003/2004. 627 p.