

УДК 543.544.42:547.781

О. О. ЗАВАДА, В. І. ГУСАРОВ, С. М. ГУБАРЬ, І. О. ЖУРАВЕЛЬ, С. М. КОВАЛЕНКО

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ СУПРОВІДНИХ ДОМІШОК У СУБСТАНЦІЇ 3-(ТРИФЛЮОРОАЦЕТИЛ)- ІМІДАЗО[1,2-А]ПІРИМІДИНУ НА СТАДІЇ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ РОЗРОБКИ ЛІКАРСЬКОГО ПРЕПАРАТУ

Розроблено методику визначення супровідних домішок в субстанції 3-(трифлюороацетил)-імідазо[1,2-а]піримідину. Вивчено хроматографічний профіль домішок вперше синтезованого похідного імідазо[1,2-а]піримідину в умовах обернено-фазового варіанту методу високоефективної рідинної хроматографії. Проведено валідацію розробленої методики.

Ключові слова: похідні імідазо[1,2-а]піримідину, метод ВЕРХ, валідація.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ

В останні десятиліття у світі спостерігається тенденція до вдосконалення механізмів системи забезпечення якості лікарських засобів (ЛЗ). Ряд європейських правил та національних настанов визначає вимоги до забезпечення якості ЛЗ протягом всього його життєвого циклу. Концепція «GxP» передбачає виконання встановлених для кожного етапу такого циклу вимог від фармацевтичної розробки до здійснення фармаконадзора за препаратами, що перебувають в обігу. Підтвердження якості активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) відповідно до вимог Державної фармакопеї України (ДФУ) здійснюється за допомогою аналітичних методик якісного та кількісного визначення різними методами аналізу. Методики аналітичного контролю мають бути валідовані. Це забезпечує одержання правильних результатів досліджень з необхідною точністю [1, 3]. Таким чином, розробка та валідація методики визначення супровідних домішок у біологічно активній субстанції на стадії фармацевтичної розробки препарату є актуальним завданням.

ВИДІЛЕННЯ НЕВИРІШЕНИХ РАНІШЕ ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ

Значна увага до похідних імідазо[1,2-а]піримідину обумовлена перш за все широким

спектром їх біологічної активності [6]. Об'єктом дослідження було обрано вперше синтезовану субстанцію 3-(трифлюороацетил)-імідазо[1,2-а]піримідину, яка проявляє антикандидозну активність та є перспективною як потенційний протигрибковий засіб.

Вибір інструментального методу аналізу для визначення супровідних домішок в субстанції 3-(трифлюороацетил)-імідазо[1,2-а]піримідину обумовлений рядом загальних вимог, таких як межі виявлення методу, похибкою, що припускається, часом і вартістю аналізу та іншими. Слід зазначити, що при розробці методики визначення сторонніх домішок у субстанції використано підхід Європейської фармакопеї (ЄФ) до оцінки якості лікарських засобів. Для визначення хроматографічного профілю та детального аналізу вмісту супровідних домішок 3-(трифлюороацетил)-імідазо[1,2-а]піримідину, перевага надана методу високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) за рахунок високої чутливості, селективності та точності визначення у порівнянні з іншими фармакопейними методами аналізу.

ФОРМУЛЮВАННЯ ЦІЛЕЙ СТАТТІ

Метою даного дослідження була розробка методики визначення супровідних домішок методом ВЕРХ в субстанції 3-(трифлюороацетил)-імідазо[1,2-а]піримідину, а також її валідація у відповідності до вимог ДФУ.

© Колектив авторів, 2013

ВИКЛАД ОСНОВНОГО МАТЕРІАЛУ

Аналітичні дослідження проводили методом ВЕРХ на хроматографі Varian ProStar (США) у наступній комплектації: градієнтна система високого тиску ProStar 210, спектрофотометричний діодно-матричний детектор ProStar 330, автосамплер ProStar 400 з об'ємом дозуючої петлі 20 мкл, термостат для колонок ProStar 500. В роботі використовували наступні розчинники та реактиви: ацетонітрил «gradient grade» (Sigma-Aldrich), 1-октансульфонат натрію (Merck), ортофосфорна кислота (Fluka).

Для хроматографічного аналізу гетероциклічних сполук найчастіше застосовують обернено-фазовий (ОФ) варіант методу ВЕРХ [2, 4, 7], з використанням колонок, що заповнені октадецилсілільним C18 силікагелем. Однак субстанція 3-(трифлюороацетил)-імідазо[1,2-а]піримідину є гідрофільною сполукою ($\log P=0.56$), тому для неї прогнозоване слабе утримання в умовах ОФ методу ВЕРХ. Хроматографічний аналіз субстанції 3-(трифлюороацетил)-імідазо[1,2-а]піримідину з використанням колонки Microsorb 100 – 5 C18, при варіюванні елюючої сили рухомої фази в інтервалі концентрацій ацетонітрилу від 20 до 80 %, показав, що вона утримується дуже погано. Використання буферних розчинів, таких як перхлоратний та фосфатний (концентрація близько 0,05 М), для створення

різних значень рН (від 3,5 до 2,2) рухомої фази також не допомогло дійти до оптимальних умов аналізу. З метою підвищення селективності нерухомої фази до полярної сполуки було використано хроматографічну колонку Ascentis® PR-Amid, однак використання сорбенту, що містить амідоалкільні групи замість алкільних, не призвело до отримання задовільних значень коефіцієнту утримання.

Для вирішення цієї проблеми використовують такий прийом, як динамічне модифікування ОФ варіанту методу ВЕРХ [8], шляхом додавання до елюенту поверхнево-активної речовини (ПАР), наприклад, натріюоктансульфонату. Адсорбція ПАР на поверхні нерухомої фази переводить хроматографічну систему до переважно іон-парних взаємодій у фазі сорбенту.

Хроматографування 3-(трифлюороацетил)-імідазо[1,2-а]піримідину в умовах ОФ варіанту методу ВЕРХ з використанням натрію октансульфонату у концентрації $0,6 \times 10^{-3}$ моль/л дозволило одержати задовільні характеристики придатності хроматографічної системи. За обраних умов проведено хроматографування випробовуваного розчину. Хроматограма наведена на рис. 1.

Параметри хроматографічної системи, які було визначено за основним піком з хроматограм випробовуваного розчину 3-(трифлюороацетил)-імідазо[1,2-а]піримідину, наведено в табл. 1.

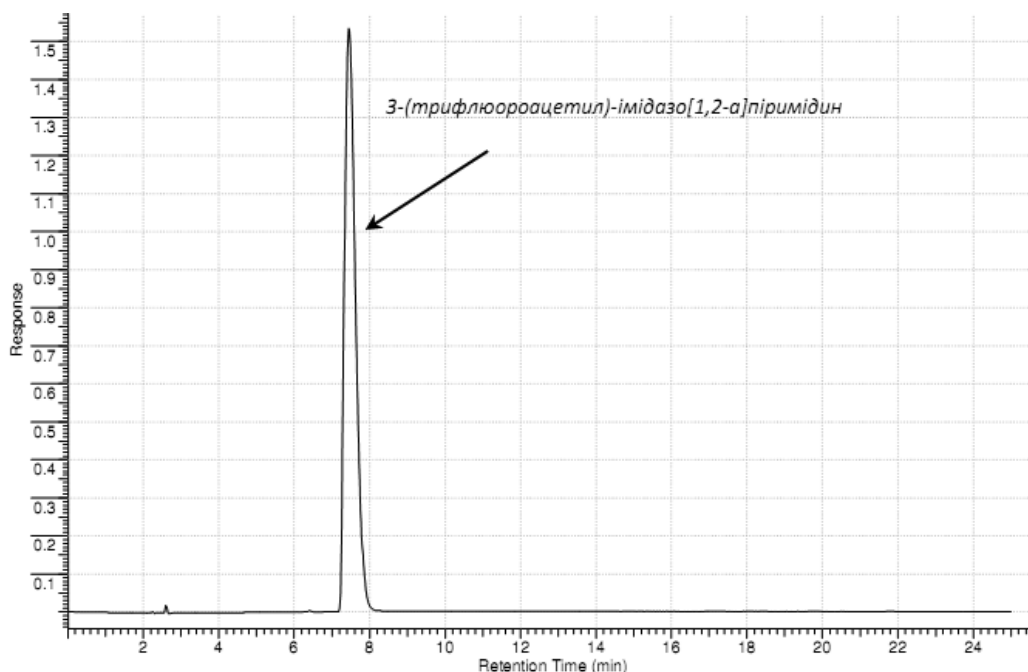


Рис. 1. Хроматограма випробовуваного розчину 3-(трифлюороацетил)-імідазо[1,2-а]піримідину (0.4 мг/мл)

Таблиця 1

**ХАРАКТЕРИСТИКИ
ХРОМАТОГРАФІЧНОЇ СИСТЕМИ**

Ефективність хроматографічної колонки	3294 теоретичних тарілок
Час утримування	близько 7 хвилин
Фактор утримування	2,3
Коефіцієнт симетрії	1,6

Відповідно до вимог ДФУ для методики випробування на граничний вміст домішок методом рідинної хроматографії мають бути визначені наступні валідаційні характеристики: специфічність та межа виявлення [5].

Відношення «сигнал-шум» при концентрації 3-(трифлюороацетил)-імідазо[1,2-а]піримідину 0,0004 мг/мл за довжини хвилі 320 нм складає

близько 3,3:1,0. Одержані дані відповідають вимогам щодо межі виявлення.

Для доведення специфічності методики було проведено порівняння хроматограм розчинів: вихідної сполуки (2-амінопіримідину), напівпродукту синтезу (імідазо[1,2-а]піримідину) та розчину субстанції 3-(трифлюороацетил)-імідазо[1,2-а]піримідину в умовах запропонованої методики (рис. 2).

Було досліджено можливість забруднення зразка продуктами розкладання шляхом витримання його у стресових умовах. Субстанція 3-(трифлюороацетил)-імідазо[1,2-а]піримідину стійка до впливу світла, але чутлива до дії розчину натрію гідроксиду: при кип'ятінні в лужному середовищі з'являється домішка невизначеної будови – домішка 1 (рис. 3).

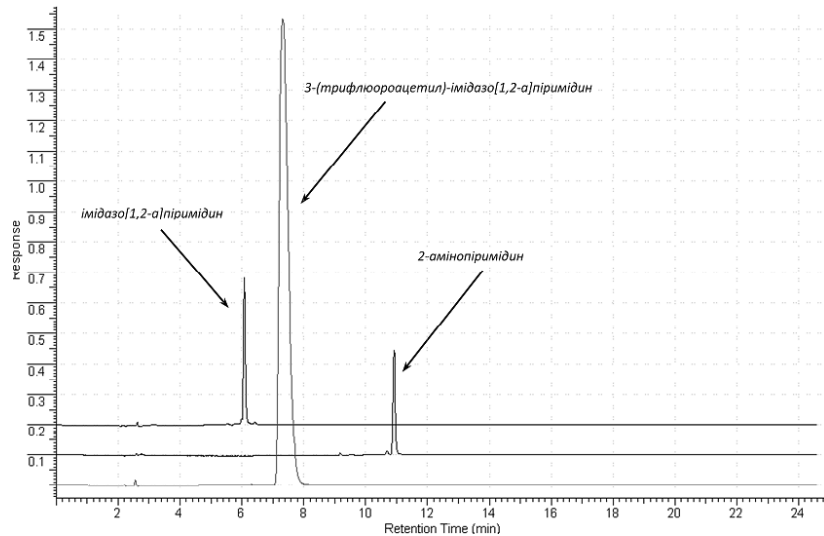


Рис. 2. Хроматограми розчинів вихідної сполуки (2-амінопіримідину), напівпродукту синтезу (імідазо[1,2-а]піримідину) та субстанції 3-(трифлюороацетил)-імідазо[1,2-а]піримідину

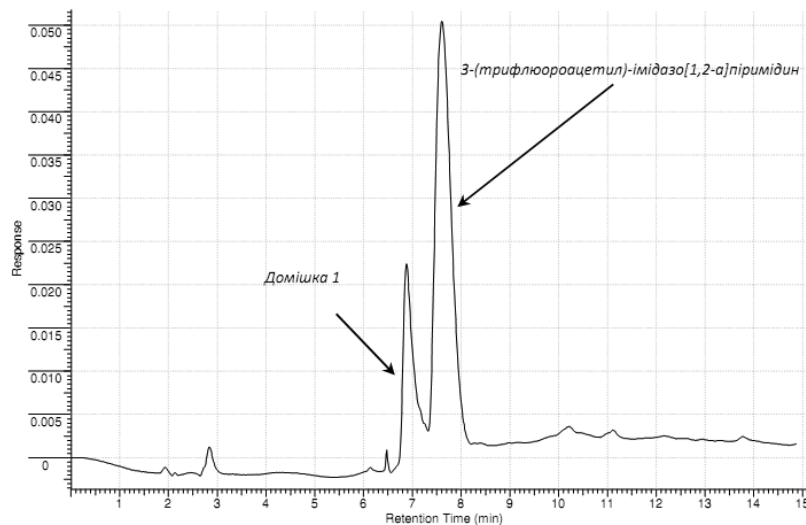


Рис. 3. Хроматограма розчину для перевірки придатності хроматографічної системи

Час утримування можливих супровідних домішок (напівпродукти синтезу) відрізняється від часу утримування 3-(трифлюороацетил)-імідазо[1,2-а]піримідину. Таким чином, в експериментально визначених умовах аналізу всі речовини добре розділяються.

На основі проведених досліджень розроблена методика визначення граничного вмісту супровідних домішок в субстанції 3-(трифлюороацетил)-імідазо[1,2-а]піримідину запропонована у наступному вигляді до проекту методів контролю якості лікарських засобів (МКЯ ЛЗ) на зазначену субстанцію:

«Визначення проводять методом рідинної хроматографії відповідно до вимог ДФУ*, 2.2.29.

Випробовуваний розчин. У мірну колбу на 50 мл поміщають 0,02 г (точна наважка) 3-(трифлюороацетил)-імідазо[1,2-а]піримідину, розчиняють у 20 мл *ацетонітрилу Р*, перемішують та доводять до позначки *водою Р*. Фільтрують крізь мембранний фільтр з діаметром пор 0,45 мкм.

Розчин порівняння. У мірну колбу на 100 мл поміщають 1 мл випробовуваного розчину та доводять до позначки *водою Р*. У мірну колбу на 10 мл поміщають 1 мл одержаного розчину, доводять до позначки *водою Р* та фільтрують крізь мембранний фільтр з діаметром пор 0,45 мкм.

Розчин для перевірки придатності хроматографічної системи. У мірну колбу на 25 мл поміщають 0,02 г (точна наважка) 3-(трифлюороацетил)-імідазо[1,2-а]піримідину, додають 5 мл *натрію гідроксиду розчину Р*, нагрівають на водяній бані протягом 4 годин із зворотнім холодильником та охолоджують. Надлишок гідроксиду натрію нейтралізують 10 % розчином *фосфорної кислоти Р*, контролюючи рН розчину за лакмусовим папером. Розчин переносять у випарну чашку та упарюють досуха на водяній бані. Отриманий залишок розчиняють у 10 мл *ацетонітрилу Р2* та фільтрують крізь мембранний фільтр з діаметром пор 0,45 мкм.

Приготування рухомої фази А. У хімічний стакан місткістю 1000 мл поміщають 1,5 г *натрію октансульфонату Р* та 4 г *натрію дигідрофосфату Р*, розчиняють у 950 мл води для *хроматографії Р* та доводять *фосфорною кислотою Р* до рН 2,2±0,05. Розчин поміщають у мірну колбу місткістю 1000 мл. Доводять об'єм розчину *водою для хроматографії Р* до позначки, перемішують та фільтрують крізь мембранний фільтр з діаметром пор 0,45 мкм.

Попеременно хроматографують по 20 мкл розчину порівняння та випробовуваного розчину на рідинному хроматографі з УФ-детектором, отримуючи не менше 5 хроматограм для кожного розчину, за наступними умовами: аналі-

тична колонка розміром 250×4,6 мм; Microsorb 100 – 5 С18; швидкість рухомої фази – 1,4 мл/хв; детектування за довжини хвилі 320 нм; температура термостату колонки – 30 °С, рухома фаза А: 0,14 % розчин *натрію октансульфонату Р* у фосфатному буферному розчині з рН 2,2±0,05; рухома фаза В: *ацетонітрил для хроматографії Р*. Ізократичний режим елюювання: рухома фаза А/рухома фаза В (80/20/об/об). Час хроматографування випробовуваного розчину має бути у 3 рази більше часу утримування

3-(трифлюороацетил)-імідазо[1,2-а]піримідину. Розчини використовують свіжоприготованими.

Придатність хроматографічної системи. На хроматограмі розчину для перевірки придатності хроматографічної системи відношення пік/западина (Нр/Нв) мінімум 3,5, де Нр – висота піку домішки 1 над екстрапольованою базовою лінією; Нв – висота над екстрапольованою базовою лінією найбільш низької точки кривої, яка розділяє пік домішки 1 від піку 3-(трифлюороацетил)-імідазо[1,2-а]піримідину.

Нормування. Площа піку будь-якої домішки не має перевищувати

2-х площ основного піка на хроматограмі розчину порівняння (0.2 %).

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ РОЗВІДОК

1. Розроблена методика визначення супровідних домішок в субстанції 3-(трифлюороацетил)-імідазо[1,2-а]піримідину методом ВЕРХ.

2. Проведена валідація розробленої методики відповідно до вимог ДФУ. Показано, що валідаційні характеристики відповідають критеріям прийнятності.

3. Запропонована аналітична методика може бути використана при розробці проекту МКЯ ЛЗ на субстанцію 3-(трифлюороацетил)-імідазо[1,2-а]піримідину.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Доповнення 2 – Х. : Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – 620 с.

2. Жидкостная хроматография некоторых производных пятичленных гетероциклов / Н. В. Соловова, С. В. Курбатова, З. П. Белоусова, Д. М. Осокин // Вестник СамГУ – Естественнонаучная серия. – 2002. – № 4 (26). – С.113-119.

3. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2011 Лікарські засоби. Належна виробнича практика /

М. Ляпунов, О. Безугла, О. Соловйов [та ін.] – К. : МОЗ України, 2010. – 169 с

4. Изучение хроматографического поведения некоторых азолов в условиях высокоэффективной жидкостной хроматографии. Сорбционные и хроматографические процессы. / Н. В. Комиссарова, А. В. Буланова, П. П. Пурыгин [и др.] – 2008. – Т. 8. – С. 964-970.

5. Настанова СРМР/ІСН з валідації аналітичних процедур Q2А, глава 7 «Межа кількісного визначення», розділ 7.2.

6. Пожарский А. Ф. // Соросовский образовательный журнал. Био-логия. 1996. 6. С. 25

7. Связь энергетических характеристик и индекса Рандича имидазола и некоторых азолов сульфокислот с хроматографическим удерживанием / Ю. Л. Полякова, А. В. Буланова, К. В. Егорова [и др.] // Известия РАН. Сер. хим. 2000. №8. С. 1401-1404

8. Сапрыкин Л. В., Хроматографический анализ витамина В6 и полупродуктов его синтеза / Л. В. Сапрыкин, Н. В. Киселева, В. Н. Васильев // Завод. Лаб. – 1990. – Том 56, № 5. – С. 16-18

УДК 543.544.42:547.781

О. А. Завада, В. И. Гусаров, С. Н. Губарь, И. А. Журавель, С. Н. Коваленко
РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОПУТСТВУЮЩИХ ПРИМЕСЕЙ В СУБСТАНЦИИ 3-(ТРИФТОРАЦЕТИЛ)-ИМИДАЗО[1,2-а]ПИРИМИДИНА НА СТАДИИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ РАЗРАБОТКИ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА

Разработана методика определения сопутствующих примесей в субстанции 3-(трифторацетил)-имидазо[1,2-а]пиримидина. Изучен хроматографический профиль примесей впервые синтезированного производного имидазо[1,2-а]пиримидина в условиях обращенно-фазового варианта метода высокоэффективной жидкостной хроматографии. Проведена валидация разработанной методики.

Ключевые слова: производные имидазо[1,2-а]пиримидина, метод ВЭЖХ, валидация.

UDC 543.544.42:547.781

О. О. Zavada, V. I. Gusarov, S. M. Gubar, I. O. Zhuravel, S. M. Kovalenko
DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHOD OF DETERMINATION RELATED SUBSTANCES IN THE SUBSTANCES 3-(TRIFLUOROACETYL)-IMIDAZO[1,2-a]PYRIMIDINE DURING THE PHARMACEUTICAL DRUG DEVELOPMENT

A HPLC method for related substances of 3-(trifluoroacetyl)-imidazo[1,2-a]pyrimidine determination was developed. The impurities of newly synthesized derivative of imidazo[1,2-a]pyrimidine chromatographic profile was studied using reversed-phase HPLC. The created HPLC methodic was validated.

Key words: imidazo[1,2-a]pyrimidine, HPLC, validation.

Адреса для листування:
 61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4.
 Кафедра управління якістю НФаУ
 Тел.: 68-56-71
 E-mail: zavadaoksana@mail.ru

Надійшла до редакції:
 05.09.2013