



УДК 543.544

Разработка методики определения фрагмента ацикловира в составе инновационного лекарственного препарата ациклогерманий методом ВЭЖХ. Идентификация основной примеси

Алешин С.В.¹, Амбросов И.В.², Матело С.К.², Шохин И.Е.³¹ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, НИИ Фармации, Москва²ООО «ВДС Фарма», Москва³ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, пос. Светлые горы

Поступила в редакцию 08.10.2015 г.

Разработана ВЭЖХ-методика определения ацикловира в составе инновационного комплексного соединения ациклогермания в фармацевтической субстанции и в лекарственной форме (геле водорастворимом). Произведена идентификация основной примеси, обнаруженной при анализе субстанции.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, ацикловир, ациклогерманий, германийорганическое соединение

The development of HPLC determination of aciclovir's fragment in new pharmaceutical substance acyclogermanium

Aleshin S.V.¹, Ambrosov I.V.², Matelo S.K.², Shokhin I.E.³¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Research Institute of Pharmacy²«WDS Pharma» LLC, Moscow³Scientific center for biomedical technologies FMBA, Svetlye gory

The objects of the study was new active pharmaceutical ingredient acyclogermanium ($\text{Ge}_2[\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7]_4[\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_3][\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2]$), organometallic germanium compound with aciclovir's fragment. A simple, rapid, and selective HPLC method was developed for the estimation of acyclovir's fragment in pharmaceutical substance and dosage form (water-soluble gel). The chromatographic behavior of the aciclovir was studied by HPLC on a reverse phase C18 column with spectrophotometric detection with recourse to eluent phosphate buffer (pH 2.5) – acetonitrile, 96:4, at a flow rate of 1.0 mL/min with UV detection at 254 ± 4 nm. The retention time of acyclovir was 3.5 minutes. The purity of the compound was also studied. The main impurity is detected and identified as guanine by UV-spectrophotometry and mass-spectrometry.

Keywords: high performance liquid chromatography, acyclovir, acyclogermanium, organic germanium.

Введение

Ациклогерманий является инновационным комплексным германий-органическим соединением, разработанным российскими учеными и

предназначенным для терапии заболеваний, вызванных герпесвирусами (вирусом простого герпеса, вирусом Эпштейна-Барра, цитомегаловирусом и др.). Одним из элементов ациклогермания является фрагмент ацикловира. В то же время данное вещество является новым германийорганическим соединением и обладает терапевтическими эффектами, характерными для данной группы препаратов, в частности, иммуномодулирующей активностью [1]. Ациклогерманий относится к классу малых молекул и является комплексным соединением, состоящим из двух атомов германия, фрагмента ацикловира, соединенных четырьмя цитрат-ионами и фрагментом аргинина. Формула соединения в общем виде: $\text{Ge}_2[\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7]_4[\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_3][\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2]$.

В результате проведенных исследований были показаны следующие ключевые преимущества ациклогермания по сравнению с представленными на рынке препаратами, содержащими нуклеозидные аналоги, в частности ацикловир:

- Более высокая растворимость в воде (>25% у ациклогермания при 0.13% у ацикловира), а также биорелевантных средах;
- Более высокая биодоступность по ацикловировому фрагменту (>90% у ациклогермания при 15-20 % у ацикловира (перорально));
- Эффективность против ацикловир-устойчивых штаммов (в частности, против штамма «L2/R»вируса простого герпеса 1-го антигенного типа из Государственной коллекции вирусов ФГУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского»);
- Ациклогерманий обладает двойным комбинированным механизмом действия: вирусингибирующим и иммуномодулирующим, что повышает эффективность противогерпесной терапии и позволяет снизить лечебные дозировки, минимизируя медикаментозную токсичность и побочные действия. В частности, в *in vivo* экспериментах на модели генитального герпеса кроликов было показано, что индекс лечебного действия лекарственной формы гель, содержащей 3% ациклогермания (с эквивалентным содержанием ацикловира 0.5%) на 23% выше, чем зарубежный коммерческий препарат в лекарственной форме крем, содержащий 5% ацикловира.
- Высокая водорастворимость ациклогермания позволяет разработать новые (в сегменте аналогов нуклеозидов противогерпетического действия) более удобные лекарственные формы (например, суппозитории, гели), отсутствующие в настоящее время на рынке [2,3].

Целью настоящего исследования являлась разработка ВЭЖХ-методики, пригодной для качественного и количественного определения фрагмента ацикловира в составе комплексной молекулы ациклогермания, для последующего включения разработанной методики в проект нормативной документации. Дополнительной задачей, возникшей в процессе исследования, стала также идентификация основной примеси, обнаруженной при анализе фармацевтической субстанции.

Эксперимент

Для качественного и количественного анализа фрагмента ацикловира в составе комплексного препарата был предложен метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. Использовался высокоэффективный жидкостный хроматограф Agilent 1260 с ультрафиолетовым детектированием, анализ полученных данных осуществлялся при помощи ПО Agilent ChemStation.

Первичная идентификация основной примеси осуществлялась при помощи масс-селективного детектора с тройным квадруполом Waters Xevo TQD, в составе хроматографической системы ACQUITY UPLC, анализ полученных данных осуществлялся при помощи ПО Waters MassLynx. Для дозирования сыпучих веществ использовались весы аналитические A&D GH-300. Все использованные в работе средства измерения зарегистрированы в государственном реестре средств измерений и имели действительные свидетельства о поверке [4].

Была использована стандартная субстанция ацикловира, производства ЗАО «ФП Оболенское». При идентификации примеси была использована стандартная субстанция гуанина производства Sigma-Aldrich. Для приготовления подвижной фазы использовался ацетонитрил для хроматографии, вода класса чистоты Milli-Q, натрия дигидрофосфата дигидрат, х.ч., кислота фосфорная концентрированная, х.ч., ацетонитрил для хроматографии.

Методика анализа ацикловира в составе фармацевтической субстанции ациклогермания. При разработке методики основными критериям являлось достижение максимальной простоты и воспроизводимости. Нормы количественного содержания ацикловира в составе ациклогермания были рассчитаны исходя из информации о структуре комплексной молекулы [5-7].

Компонент А подвижной фазы. 6.24 г натрия дигидрофосфата дигидрата растворяют в 800 см³ воды очищенной. Доводят раствор фосфорной кислотой концентрированной до значения рН 2.5 потенциометрически. Доводят объем раствора до 1000 см³ водой очищенной. Компонент Б подвижной фазы – ацетонитрил для хроматографии. Испытуемый раствор. Около 0.1 г (точная навеска) испытуемой субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³, растворяют в подвижной фазе, доводят объем раствора подвижной фазой до метки. 5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 см³, доводят объем раствора подвижной фазой до метки. Срок годности раствора 1 сутки. Стандартный раствор. Около 0.1 г (точная навеска) субстанции ацикловира (Aciclovir USP Reference Standard, кат. № 1012065 или аналогичного качества) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде очищенной, доводят объем раствора подвижной фазой до метки. 5 см³ полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 см³, доводят объем раствора подвижной фазой до метки. Срок годности раствора 1 сутки.

Таблица 1. Хроматографические условия приведены

Колонка	C18, 250 мм x 4.6 мм, 5 мкм
Температура колонки	25°C
Подвижная фаза	Компонент А и Компонент Б в соотношении 94:6
Скорость потока	1 см ³ /мин
Детектор	УФ-детектор, длина волны 254±4 нм
Объем пробы	10 мкл
Время анализа	10 мин

Время удерживания пика ацикловира около 3.5 мин. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

-Относительное стандартное отклонение площади пика ацикловира (RSD), рассчитанное по 6 хроматограммам стандартного раствора, не должно превышать 2%.

-Эффективность колонки (N), рассчитанная по пику ацикловира, должна быть не менее 10000 теоретических тарелок.

-Фактор симметрии пика ацикловира должен составлять не менее 0.7.

Хроматографируют растворитель (воду), стандартный раствор (не менее 6 раз), испытуемый раствор (не менее 2 раз). Содержание ацикловира в препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{P \cdot S_1 \cdot a_0}{S_0 \cdot a_1},$$

где S_1 – площадь пика ацикловира на хроматограмме испытуемого раствора (среднее значение); S_0 – площадь пика ацикловира на хроматограмме стандартного раствора (среднее значение); a_1 – навеска субстанции в граммах; a_0 – навеска стандартного образца ацикловира в граммах; P – содержание основного вещества в стандартном образце ацикловира в процентах. Содержание ацикловира в субстанции ациклогермания должно быть в пределах от 15.0% до 17.0%.

Модификация методики для анализа вещества в лекарственной форме. Высокая растворимость в воде молекулы ациклогермания позволяет адаптировать методику для анализа вещества в лекарственной форме с минимальными изменениями. Отличия заключаются в методике приготовления испытуемого раствора и соответствующей корректировке расчетной формулы, которая также зависит от концентрации геля.

Приготовление испытуемого раствора для геля. Около 1 г (точная навеска) испытуемого геля помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³, растворяют в воде очищенной, доводят объем раствора водой очищенной до метки, тщательно перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0.45 мкм. Непосредственно перед использованием 5 см³ полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 см³, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают.

Идентификация основной примеси. При проведении хроматографического анализа некоторых образцов субстанции ациклогермания было установлено наличие небольшого характерного пика примеси с временем удерживания около 3 минут, время удерживания относительно пика ацикловира около 0.75. Спектр поглощения пика примеси, снятый при помощи применяемого для хроматографического анализа УФ-детектора, в значительной степени совпадал с соответствующим спектром ацикловира. Возникла необходимость идентификации данной примеси с целью определения допустимости ее содержания (путем установления по литературным данным класса опасности для данного вещества), а также для выдвижения гипотезы относительно возможных причин появления примеси и способов их устранения.

С целью первичной идентификации примеси был предложен метод хромато-масс-спектрометрии. Для этого опыт исследования образца субстанции ациклогермания был в точности воспроизведен на жидкостном хроматографе, снабженном УФ-детектором, а также масс-селективным детектором с тройным квадруполом. В результате были получены хроматограммы образца, снятые при помощи УФ-детектора, на которых наблюдались характерные пики ацикловира и основной примеси, а также произведено масс-спектрометрическое сканирование по всему диапазону масс. Во временной точке, соответствующей на хроматограмме пику основной примеси, на масс-спектре был обнаружен характеристический ион с отношением m/z около 152. В результате анализа литературных данных было выдвинуто предположение, что данный ион соответствует гуанину (рис. 1-2) [8,9]. Гуанин (2-амино-1Н-пурин-6(9Н)-он), молярная масса 151.13 г/моль, является одной из примесей, характерной для ацикловира, продуктом его термического разложения. Европейская фармакопея 5 издания определяет его как допустимую примесь и

регламентирует ее количественное содержание не более 0.7% относительно ацикловира.



Рис. 1 Возможная схема ионизации гуанина

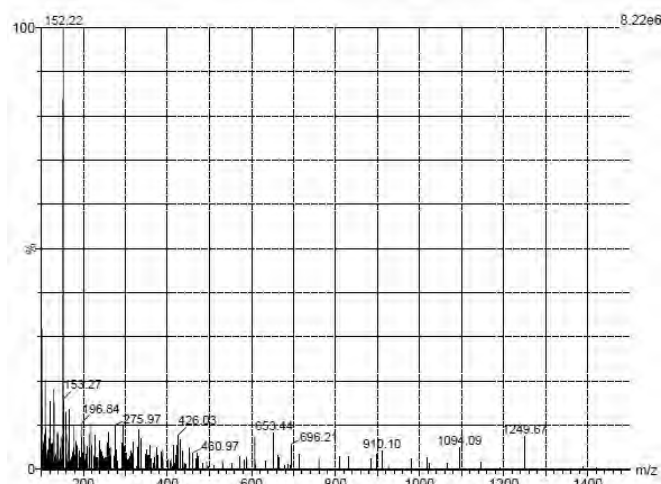


Рис. 2. Масс-спектр пика примеси гуанина
(полное сканирование, вычитание фона не производилось)

С целью проверки и подтверждения произведенной идентификации примеси было проведено исследование образца стандартной субстанции гуанина. Около 0.01 г субстанции гуанина (точная навеска) растворяли в 100 мл воды очищенной, подкисленной ортофосфорной кислотой до значения pH 2.0. Данное значение pH соответствует показателю pH для 1% раствора субстанции ациклогермания. Хроматографировали полученный раствор согласно методике хроматографического анализа ациклогермания.

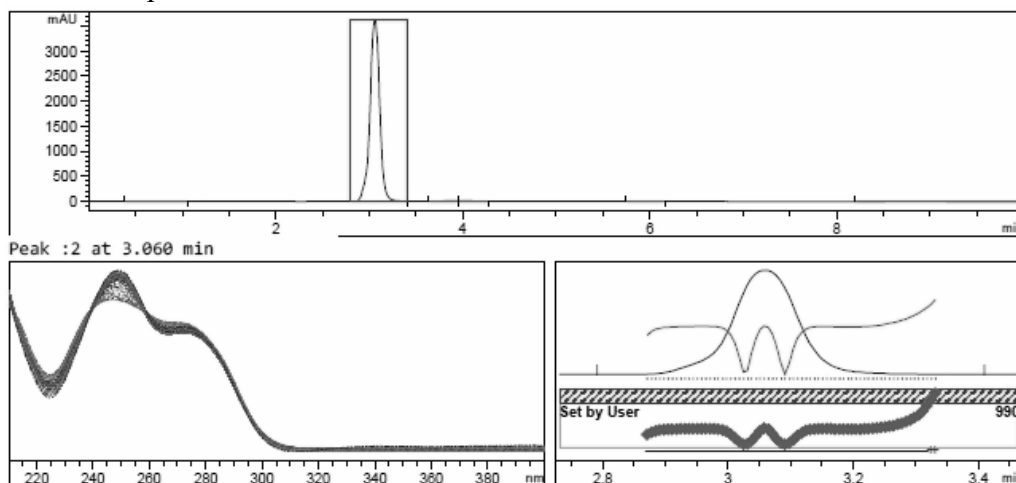


Рис. 3. Оптический спектр основного пика
на хроматограмме стандартного образца гуанина

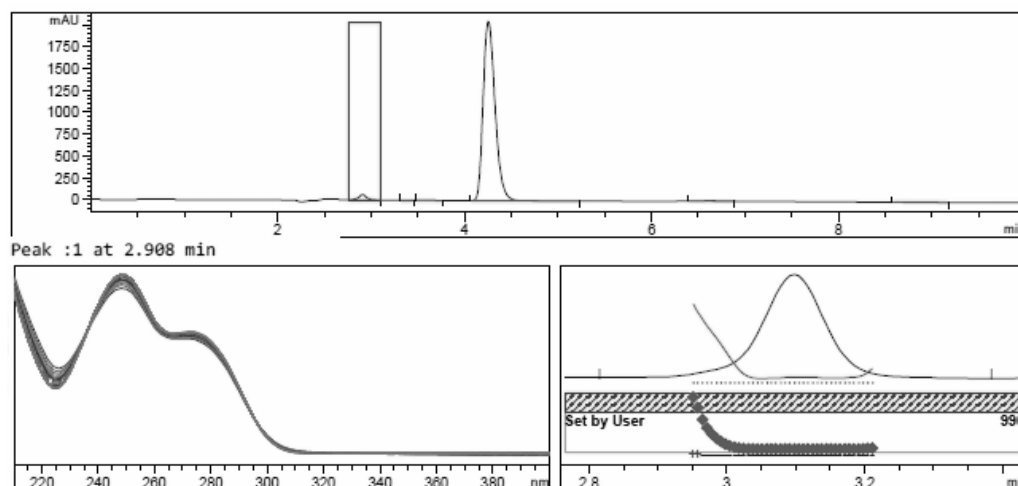


Рис. 4. Оптический спектр пика основной примеси на хроматограмме образца ациклогермания.

В результате проведенного исследования было установлено, что время удерживания пика гуанина в данных условиях близко к времени удерживания пика основной примеси на хроматограмме образца ациклогермания, форма их спектров поглощения в УФ-области также совпадает (рис. 3-4).

На основании проведенных исследований можно сделать вывод о том, что основная примесь, имеющая на хроматограммах образцов ациклогермания (относительное время удерживания по ацикловиру около 0.75 и абсолютное около 3 минуты), с высокой вероятностью может являться гуанином.

Заключение

Разработана ВЭЖХ-методика определения фрагмента ацикловира в составе инновационного лекарственного препарата ациклогермания. Данная методика может быть использована как для качественного, так и для количественного анализа данного вещества, как в субстанции, так и в лекарственной форме. Произведена идентификация основной специфической примеси в субстанции. В случае использования стандартного образца гуанина разработанная методика определения ацикловира может быть с минимальными изменениями модифицирована для количественного анализа основной примеси.

Список литературы

1. Амченкова А.М. и др. Сб. науч. Трудов «Интерферон-89». М. 1989. С. 35-37.
2. Исаев А.Д. и др. Патент РФ № 2475436. 2013 (PCT WO2013/112072).
3. Исаев А.Д. и др. Патент РФ № 2487878. 2013. (PCT WO2013/172732).
4. Государственный реестр средств измерений. URL: http://www.fundmetrology.ru/10_tipy_si/7list.aspx (дата обращения 22.02.2015).
5. Европейская фармакопея. 7.0. Страсбург. 2011. 1812 с.
6. Миронов А.Н. и др. Руководство по экспертизе лекарственных средств. М. Гриф и Ко. 2013. Т. 2. 280 с.
7. Руководство по инструментальным методам исследования при разработке и экспертизе качества лекарственных препаратов / под ред. С.Н. Быковского и др. М. Перо. 2014. С. 80-118.

8. Карасек Ф., Клемент Р. Введение в хромато-масс-спектрометрию. М. Мир. 1993. 235 с.

9. Gregson J. Mass spectrometry of nucleosides related to guanosine, and codicillary research topics. Diss. Utah. 1994. pp. 30-45.

References

1. Amchenkova A.M. et al., *Sb. nauch. Trudov «Interferon–89»*, М., 1989, pp. 35-37.

2. Isaev A.D. et al., *Patent RU № 2475436*, 2013 (PCT WO2013/112072), Patentee & Applicant «WDS Pharma LLC».

3. Isaev A.D. et al., *Patent RU № 2487878*, 2013, (PCT WO2013/172732), Patentee & Applicant «WDS Pharma LLC».

4. Gosudarstvennyi reestr sredstv izmerenii. URL:

http://www.fundmetrology.ru/10_tipy_si/7list.aspx (data obrashcheniya 22.02.2015).

5. “European Pharmacopoeia 7.0”, Council of Europe. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM), 2011.

6. Mironov A.N. et al., *Rukovodstvo po ekspertize lekarstvennykh sredstv*, М, Grif i Ko, 2013, Vol. 2, 280 p.

7. *Rukovodstvo po instrumental'nym metodam issledovaniya pri razrabotke i ekspertize kachestva lekarstvennykh preparatov*, pod red. S.N. Bykovskogo et al., М., Pero, 2014, pp. 80-118.

8. Karasek F., Klement R., *Vvedenie v khromato-mass-spektrometriyu*, М., Mir, 1993, 235 p.

9. Gregson J., *Mass spectrometry of nucleosides related to guanosine, and codicillary research topics*, Diss., Utah, 1994., pp. 30-45.

Алешин Сергей Валерьевич – аспирант НИИ Фармации, Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва

Амбросов Игорь Валерьевич – к.б.н., ООО «ВДС Фарма» (разработка, синтез и исследования новых германий-органических соединений), компания-резидент Инновационного центра «Сколково», Москва

Матело Светлана Константиновна – к.м.н., ООО «ВДС Фарма» (разработка, синтез и исследования новых германий-органических соединений), компания-резидент Инновационного центра «Сколково», Москва

Шохин Игорь Евгеньевич – к.фарм.н., зав. лаборатории фармакокинетики и лекарственных форм ФГБУН НЦБМТ ФБМА России, Светлые горы

Aleshin Sergey V. – the postgraduate student I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Research Institute of Pharmacy, Moscow, e-mail neos.1991@gmail.com

Ambrosov Igor V. - Ph.D., «WDS Pharma» LLC, Moscow (resident of Skolkovo Innovation Center), R&D of new organic germanium compounds, Moscow, email: igor.ambrosov@wdspharma.ru

Matelo Svetlana K. – «WDS Pharma» LLC, Moscow (resident of Skolkovo Innovation Center), R&D of new organic germanium compounds, Moscow

Shohin Igor E. – Ph.D., -head of pharmacokinetics and dosage form laboratory, Scientific center for biomedical technologies FMBA, Svetlye gory