

## ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ТСХ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ПОСТОРОННИХ ПРИМЕСЕЙ В ПРОТИВОЭПИЛЕПТИЧЕСКОМ ПРЕПАРАТЕ

Г. А. Ким, О. А. Деханова, И. А. Соколова, **И. А. Девяткина**

*Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова*

Поступила в редакцию 29.03.2008 г.

**Аннотация.** В статье представлены результаты исследований по разработке методики обнаружения родственных примесей в субстанции Габапентин (МНН), содержащей 1-аминометилциклогексануксусную кислоту и обладающей противоэпилептической активностью. На основании экспериментальных исследований обоснован выбор хроматографических пластинок, условий обнаружения посторонних примесей, установлены параметры теста на пригодность выбранной хроматографической системы.

**Ключевые слова:** субстанция, родственные примеси, хроматография, габапентин, подвижная фаза, хроматографическая система

**Abstract.** In this article results of researches of development of method for related substances detection in Gabapentin, containing 1-aminomethylcyclohexanacetic acid which possess antiepileptic activity presented. After experimental researches we have explained the choice of chromatography plates, of detection conditions, of chromatography system and conditions of the test for suitability chosen chromatography system.

**Key words:** substance, relative impurities, chromatography, gabapentin, mobile phase, chromatography system

Целью настоящей работы являлась оптимизация экспресс-методики обнаружения посторонних примесей в субстанции, содержащей 1-аминометилциклогексануксусную кислоту (МНН Габапентин), обладающей противоэпилептической активностью с использованием метода тонкослойной хроматографии. Основными достоинствами метода ТСХ являются — простота и скорость проведения эксперимента, доступность аппаратуры, четкость разделения.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Субстанцию 1-аминометилциклогексануксусной кислоты.

Пластины хроматографические: Kieselgel 60F254 (стекло), Kieselgel 60F254(алюминий), Kieselgel 60F254 НРТLC, Сорбфил ПТСХ-П-УФ.

Реактивы: метанол, раствор калия перманганата, хлорная камера, раствор о-толидина.

Условия хроматографирования:

- Сорбент — Kieselgel 60F254 (10 x 15 см) или Сорбфил ПТСХ-П-УФ;
- Подвижная фаза (ПФ) — спирт изопропиловый-вода (95 : 5);
- Высота пробега ПФ — 5—6 см;
- Количество наносимого испытуемого вещества — 1000 мкг;

- Количество вещества для оценки примеси — 5 мкг (в растворе сравнения);

- Обнаружение — раствор калия перманганата, нагрев при 110 °С.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве исходной методики обнаружения примесей в субстанции габапентин использовали методику, представленную разработчиками синтеза субстанции. Имеющаяся методика была проанализирована и экспериментально воспроизведена, в результате чего было установлено, что при исполнении всех условий теста иногда наблюдаются различия в получаемых результатах и требуется введение в методику более точных указаний параметров. Нами установлено что:

- в методике не указано время нагрева пластины, обработанной раствором калия перманганата, хотя это является одним из ключевых моментов. Кроме того не было отмечено, что при недостаточной выдержке хроматограмм плохо проявляются пятна свидетелей, в то время как при слишком длительной выдержке — пластинка «выцветает» и не поддается оценке;

- установить время выдержки очень сложно, так как оно зависит не только от степени смачивания сорбента при опрыскивании раствором калия перманганата, но и от типа сорбента и, даже от расположения пластинки внутри термостата;

• нагрузка на сорбент 1000 мкг габапентина слишком велика, даже для пластинок Kieselgel 60F254, а на пластинках Сорбфил ПТСХ-П-УФ искажается вся картина в результате прогиба фронта ПФ.

Для оптимизации имеющейся методики ТСХ было необходимо оптимизировать сорбент и способ обнаружения. Кроме того, нами предложено двумерное хроматографирование для подтверждения отсутствия примесей, имеющих сходную с габапентином величину  $R_f$  в заданных условиях эксперимента.

Прежде всего, для снижения нагрузки испытуемого препарата была проверена чувствительность его определения в описанных условиях.

Обнаружено, что при нанесении пробы раствора полосой шириной 1 см чувствительность определения составляет 1—1,5 мкг в зависимости от сорбента, что позволяет снизить наносимое количество испытуемого вещества до 500 или даже, до 400 мкг. При этом такое количество субстанции следует наносить полосой шириной 2 см для обеспечения равномерной хроматографической подвижности.

Кроме того, обнаружению габапентина по предложенной разработчиками методике мешает «второй фронт», расположенный непосредственно над пятном примеси.

В связи с этим, были проверены следующие параметры А и Б:

Параметр А: Сорбенты: Kieselgel 60F254 (стекло), Kieselgel 60F254 (алюминий), Kieselgel 60F254 НРТЛС, Сорбфил ПТСХ-П-УФ. Для улучшения хроматографической подвижности и четкости обнаружения сорбенты Kieselgel 60F254 (алюминий) и Kieselgel 60F254 НРТЛС были предварительно промыты:

- ПФ, (1 пластинка перед испытанием активировалась при 100 °С, другая — нет);
- Метанолом (1 пластинка перед испытанием активировалась при 100 °С, другая — нет);
- Высота пробега ПФ — 6 см.

Количество испытуемого вещества — 500 мкг (наносят полосой 2 см).

Количество вещества для оценки примеси — 1 мкг (0,2 %) и 2 мкг (0,4 %); наносят полосой 1 см).

Обнаружение — раствор калия перманганата, нагрев при 110 °С, время варьировалось.

При оценке полученных хроматограмм установлено что:

• Kieselgel 60F254 (стекло) — содержание примеси (одно пятно с  $R_s \sim 5$ ) около 0,5 %. Опрыскивания недостаточно. Для лучшего обнаружения

требуется окунуть пластинку в лоток с раствором калия перманганата;

• Kieselgel 60F254 (алюминий) — пятна размытые, хроматографическая картина нечеткая, «второй фронт» мешает оценке примесей;

• Kieselgel 60F254 (алюминий, промытая метанолом) — пятно примеси ( $R_s \sim 4,5$ ) наблюдается в следовых количествах (менее 0,2 %);

• Kieselgel 60F254 (алюминий, промытая метанолом, активированная) — принципиальных различий с хроматограммой «с» нет;

• Kieselgel 60F254 НРТЛС — пятно примеси в следовых количествах (менее 0,2 %). Плохая воспроизводимость обнаружения: проверены режимы 100 °С, 5 мин и 115 °С 6 мин;

• Kieselgel 60F254 НРТЛС (промытая метанолом) — пятно примеси нечеткое, содержание менее 0,4 %;

• Kieselgel 60F254 НРТЛС (промытая метанолом, активированная) — пятно примеси более четкое, менее 0,4 %;

• Сорбфил ПТСХ-П-УФ — пятна испытуемого вещества искажены, сильный прогиб «второго фронта», примеси не оцениваются;

• Предварительная промывка ПФ с активацией или без нее не дала улучшения результатов;

• Различная ширина полосы испытуемого препарата и свидетеля затрудняет оценку.

Параметр Б: Способ обнаружения.

Для хроматографирования использовалась хлорная камера с последующим опрыскиванием раствором о-толидина.

Чувствительность обнаружения габапентина при нанесении полосой шириной 1,5 см составляет, в зависимости от сорбента, от 0,05 до 0,1 мкг. Это позволило принципиально снизить наносимое количество испытуемого вещества до 50 или 100 мкг в зависимости от сорбента.

Проверены следующие условия:

Сорбенты: Kieselgel 60F254 (стекло), Kieselgel 60F254 (алюминий), Kieselgel 60F254 НРТЛС, Сорбфил ПТСХ-П-УФ.

Высота пробега ПФ — 6 см.

Количество испытуемого вещества — 50 мкг и 100 мкг Kieselgel 60F254 (стекло); наносят полосой 1,5 см.

Количество вещества для оценки примеси — 0,25 мкг (0,5 %), 0,1 мкг (0,2 %) для нагрузки 50 мкг или 0,5 мкг (0,5 %) и 0,2 мкг (0,2 %) для нагрузки 100 мкг; наносят полосой 1,5 см.

Обнаружение — хлорная камера с последующим опрыскиванием раствором о-толидина.

При оценке полученных хроматограмм установлено что:

- Kieselgel 60F254 (стекло) — при нагрузке 50 мкг пятно примеси ( $R_s \sim 5$ ) слабо заметно, при этом пятно свидетеля 0,1 мкг четко различимо. При нагрузке 100 мкг примесь поддается оценке при содержании менее 0,2 %. Избыток хлора легко удаляется при продувке холодным воздухом в течение 15 мин. После проявления обнаруживаются синие пятна на белом фоне;

- Kieselgel 60F254 (алюминий) — не удается полностью удалить избыток хлора. При выдержке 30 мин под тягой, 15 мин в интенсивном токе холодного воздуха, 5 мин в токе холодного воздуха и 15 мин в сушильном шкафу с принудительной вентиляцией при температуре 50 °С. После проявления о-толидином фон хроматограммы остается голубым, оценка примеси затруднена;

- Kieselgel 60F254 НРТLC получен оптимальный результат. Содержание примеси ( $R_s \sim 5,5$ ) около 0,2 %, результаты хроматографирования трех отдельных определений идентичны. На белом фоне пластинки наблюдаются четкие синие пятна;

- Сорбфил ПТСХ-П-УФ — чтобы избежать прогиба фронта ПФ камеру, обложенную фильтровальной бумагой, насыщали в течение 1 часа, удаление избытка хлора проводили в токе холодного воздуха в течение 20 мин, при этом фон хроматограммы оставался бледно голубым, содержание примеси было определено как — менее 0,2 %. Величина  $R_s$  примеси  $\sim 12$  за счет низкой величины  $R_f$  основного пятна.

Таким образом, оптимальные и воспроизводимые результаты получены при следующих параметрах:

- Сорбент — Kieselgel 60F254 НРТLC;
- Количество наносимого испытуемого вещества — 50 мкг;
- Количество свидетелей — 0,25 мкг (0,5 %) и 0,1 мкг (0,2 %);
- Нанесение — полосой шириной 1,5 см;
- Высота пробега ПФ — 6 см;
- Обнаружение — хлорная камера (15 мин), удаление избытка хлора 10 мин в токе холодного воздуха, опрыскивание раствором о-толидина;
- Чувствительность определения габапентина — около 0,05 мкг.

Примечание: допустимо использование сорбента Сорбфил ПТСХ-П-УФ, но при этом следует контролировать насыщение хроматографической камеры, увеличить время удаления избытка хлора.

Таким образом на основании проведенных исследований нами предложена следующая методика определения посторонних примесей в субстанции габапентина:

Навеску субстанции габапентина 0,025 г (точная навеска) растворяют в 10 мл спирта метилового (раствор А). 0,25 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем спиртом метиловым до метки, перемешивают (раствор Б).

На линию старта хроматографической пластинки Kieselgel 60F254 НРТLC или Сорбфил ПТСХ-П-УФ наносят полосами шириной 1,5 см 0,02 мл раствора А (50 мкг), 0,02 мл (0,25 мкг) и 0,008 мл (0,1 мкг) раствора Б.

Пластинку высушивают на воздухе в течение 5 мин и помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 2 час парами подвижной фазы (ПФ), состоящей из смеси растворителей спирт изопропиловый — вода в соотношении 95 : 5.

Когда фронт подвижной фазы пройдет 6 см, пластинку вынимают из камеры, высушивают под тягой в токе холодного воздуха в течение 15 мин, помещают в камеру для хлорирования на 15 мин, выветривают избыток хлора в токе холодного воздуха в течение 15 мин (Kieselgel 60F254 НРТLC) или 30 мин (Сорбфил ПТСХ-П-УФ), опрыскивают раствором о-толидина и проводят оценку хроматограммы.

Пятно единичной примеси на хроматограмме раствора А по совокупности величины и интенсивности не должно превышать пятно свидетеля 0,25 мкг на хроматограмме раствора Б (не более 0,5 %).

Суммарное содержание примесей не должно превышать 1,0 %.

Примечания. 1. Пятно свидетеля 0,1 мкг используется для проверки пригодности хроматографической системы.

2. Проверка пригодности хроматографической системы.: Система считается пригодной, если основное пятно на хроматограмме раствора А компактной формы, пятна на хроматограммах раствора Б имеют величину  $R_f$  не менее 0,05, пятно свидетеля 0,1 мкг хорошо различимо.

Кроме того, нами проведено двумерное хроматографирование для подтверждения отсутствия примесей (однородности пятна), имеющих сходную с габапентином величину  $R_f$  в заданных условиях хроматографирования.

Для этого в насыщенную камеру помещают две пластинки с пробами (50 мкг). Когда фронт ПФ прошел до отметки 6 см, пластинки извлекают из камеры, высушивают. На одной пластинке прово-

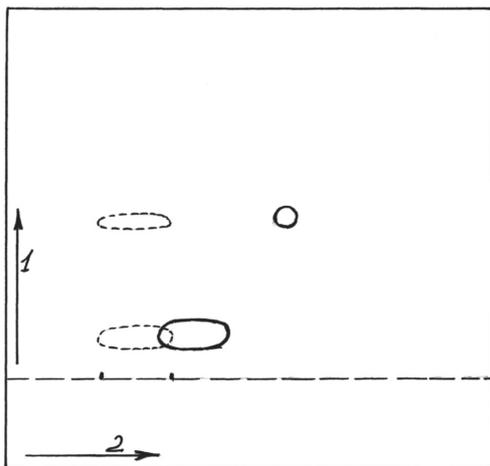


Рис. 1. Двухмерное хроматографирование габапентина. Пунктирной линией обозначены результаты разделения в первом направлении

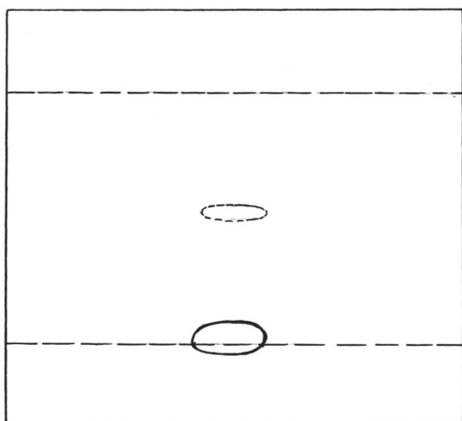


Рис. 2. ПФ изопропиловый спирт – метанол 95 : 5

для обнаружения габапентина как указано в предложенной нами методике (рис. 1, направление 1), а другую помещают в ту же камеру, повернув на 90°. Результаты двухмерного хроматографирования представлены на рис. 1, направление 2.

Как видно из рис. 1 в субстанции габапентина присутствует единичная примесь с величиной  $R_f$  около 0,6. При двухмерном хроматографировании не было обнаружено дополнительных примесей

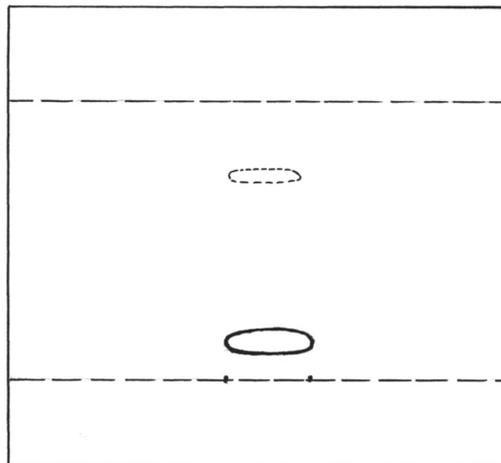


Рис. 3. ПФ изопропиловый спирт – метанол 85:15

под основным пятном. Пятна примесей располагаются строго по диагонали, что свидетельствует об устойчивости основного соединения в процессе хроматографирования.

Кроме того, было предпринято разделение габапентина в ПФ изопропиловый спирт — метанол (95 : 5) и изопропиловый спирт — метанол (85 : 15). Как видно из рис. 2 и 3 в анализируемом образце присутствует только одна примесь с величиной  $R_s$  более 1 по габапентину. Изменение хроматографической подвижности основного пятна не показало наличие примеси, имеющей сходную с габапентином величину  $R_f$ .

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ф. Гейсс. Основы тонкослойной хроматографии (планарная хроматография), том 1, 2, Москва, 1999.
2. Э. Шталь. Хроматография в тонких слоях. Мир, Москва, 1965.
3. О.Б. Рудаков. Растворитель как средство управления процессом в жидкостной хроматографии. Воронеж: ВГУ, 2003.
4. О.Б. Рудаков, И.П. Сидищев. Обобщенный критерий полярности растворителей как средство управления хроматографическим процессом. Известия Академии наук. Сер. Химическая. № 1, 2003, С. 17—19.

**Ким Г. Н.** — ассистент кафедры общей фармацевтической и биомедицинской технологии ММА им. И. М. Сеченова; тел.: (910) 436-5329

**Деханова О. А.** — зав. лаб. анализа ГЛС ОАО ЦХ ЛС ВНИХФИ; тел.: (495) 245-0953

**Соколова И. А.** — заместитель генерального директора ООО «ПИК-ФАРМА»; тел.: (495) 925-5700

**Kim G. A.** — assistant at the Chair of OEPH and BMT Moscow Medical Academy named after Sechenov; tel.: (910) 436-5329

**Dekhanova O.A.** — Director of Laboratory analysis; tel.: (495) 245-0953

**Sokolova I. A.** — Deputy director of quality of Pik-Pharma Ltd.; tel.: (495) 925-5700