Journal of Siberian Federal University. Chemistry 3 (2010 3) 260-267
~ ~ ~

УДК 615.277.3.07

Определение посторонних примесей в субстанции диборнола методом ВЭЖХ

Е.Е. Назмутдинова[a], Е.А. Краснов[a]*, Е.Г. Струкова[b], А.А. Ефремов[b], М.Л. Белянин[c]

[a] *Сибирский государственный медицинский университет, Россия 634050, Томск, ул. Московский тракт, 2*

[b] *Сибирский федеральный университет, Россия 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79*

[c] *Томский политехнический университет, Россия 634034, Томск, пр. Ленина, 30* [1]

Received 6.09.2010, received in revised form 13.09.2010, accepted 20.09.2010

Представлены результаты разработки методики и оценки ее пригодности (валидации) определения посторонних примесей в субстанции диборнола (4-метил-2,6-диизоборнилфенола) методом ВЭЖХ. Валидация проведена на этапе подготовки проекта фармакопейной статьи предприятия на субстанцию диборнола.

Ключевые слова: диборнол, 4-метил-2,6-диизоборнилфенол, ВЭЖХ, валидация.

Диборнол (4-метил-2,6-диизоборнилфенол) – новый полусинтетический антиоксидант из группы пространственно-затрудненных фенолов, обладающий антирадикальной, гемореологической, антитромбоцитарной и антитромбогенной активностью [1, 2].

В связи с наличием вышеперечисленных свойств диборнол проявил высокую фармакологическую активность на моделях таких социально значимых заболеваний, как нарушение мозгового кровообращения и сосудистые заболевания глаз [3, 4].

За последние годы значительно изменилась приоритетность в отношении критериев, предъявляемых к потенциальным лекарственным средствам (ЛС). Внимание исследователей все больше направлено на поиск безопасных ЛС, обладающих низким порогом токсичности и высокой безвредностью. Результаты экспериментов по изучению острой токсичности диборнола свидетельствуют о его принадлежности к четвертому классу опасности – «малоопасные вещества» [5].

Таким образом, диборнол является новым перспективным антиоксидантом с низкой токсичностью, который обладает выраженным влиянием на реологию крови, сосудисто-тромбоцитарный гемостаз.

Для завершения этапа доклинических исследований и дальнейшего внедрения диборнола в медицинскую практику необходимо

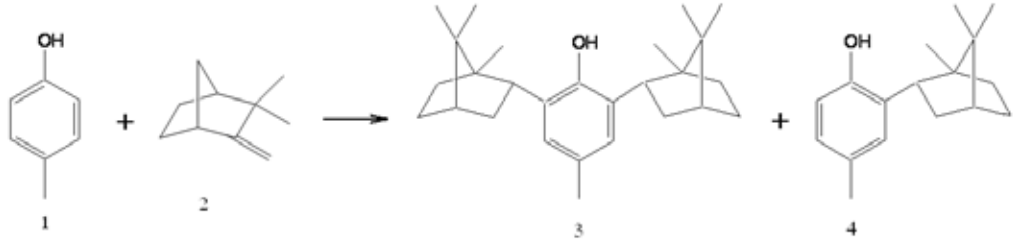
* Corresponding author E-mail address: krasnov.37@mail.ru

[1] © Siberian Federal University. All rights reserved

разработать методики контроля безопасности диборнола, а именно контроль посторонних примесей в субстанции.

Целью настоящей работы стала разработка и валидация методики определения посторонних примесей в субстанции диборнола методом ВЭЖХ.

Синтез диборнола осуществляют путем алкилирования *пара*-крезола (1) камфеном (2) в присутствии катализатора *пара*-крезолята алюминия при температуре 180 °С в течение 6 ч. Контроль за ходом реакции проходит методом ГЖХ. Для разложения катализатора используется хлороводородная кислота. Непрореагировавшие крезол и камфен отгоняют при пониженном давлении. После перекристаллизации из этанола выделяют целевой продукт 4-метил-2,6-диизоборнилфенол (3). В качестве побочного продукта реакции возможно образование моноалкилированного *пара*-крезола (4) [6].



Материалы и методы

Определение посторонних примесей проводили методом обращенно-фазной ВЭЖХ, при этом использовали следующее оборудование: высокоэффективный жидкостной хроматограф Agilent Technologies 1200 (США), снабженный диодно-матричным детектором, колонка Zorbax Eclipse XDB C-18, 5 мкм, размер 4,6×150 мм. Подвижная фаза – вода-ацетонитрил. Реактивы, используемые в работе, были ВЭЖХ чистоты фирмы Pancreac.

В работе использовали образцы примесей *п*-крезола фирмы Fluka (Германия) и 4-метил-6-изоборнилфенола, рабочий стандартный образец диборнола, синтезированные в Институте химии Коми НЦ УрО РАН под руководством член-корр. РАН А.В. Кучина.

Результаты и их обсуждение

В качестве посторонних примесей в субстанции диборнола могут содержаться *п*-крезол и камфен – исходные вещества в синтезе диборнола и побочный продукт синтеза – 4-метил-2-изоборнилфенол. Камфен относится к IV классу токсичности, *п*-крезол и 4-метил-2-изоборнилфенол – к III классу токсичности [7-9]. Исходя из этого целесообразно проводить контроль *п*-крезола (примесь I) и 4-метил-2-изоборнилфенола (примесь II). При разработке методики необходимо было подобрать оптимальные условия для эффективного разделения веществ за минимальное время анализа, для этого варьировали состав подвижной фазы и скорость потока. Наиболее приемлемое разделение исследуемых веществ достигалось при следующих условиях: подвижная фаза вода:ацетонитрил в соотношении 60:40 в режиме градиентного элюирования до соотношения 5:95 в течение 4 мин, скорость потока 1,2 мл/мин, затем вода:ацетонитрил в соотношении 5:95 в режиме изократического элюирования, скорость потока 1,5 мл/мин, длина волны детектирования 282 нм, объем пробы 20 мкл, температура термостата колонки 40 °С, время анализа 15 мин.

Валидацию аналитической методики проводили по следующим параметрам:

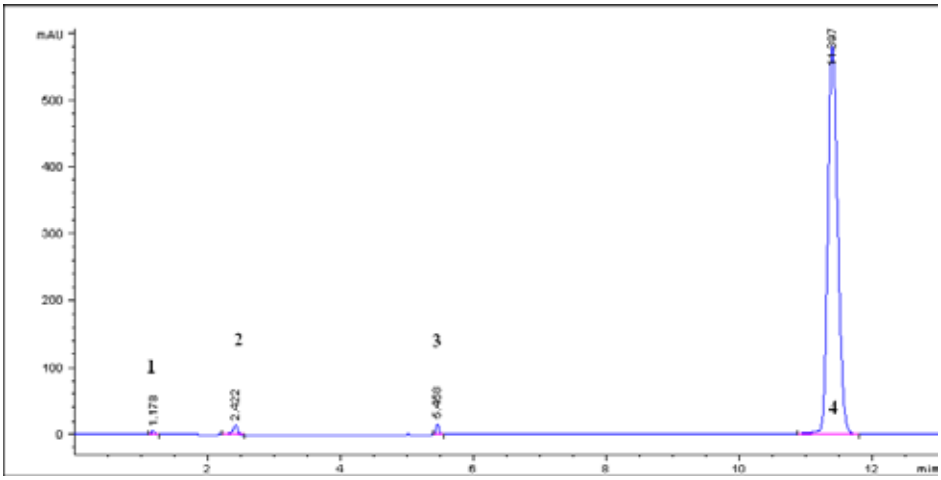


Рис. 1. Хроматограмма модельной смеси диборнола (1 мг/мл) и примесей I, II (0,005 мг/мл) в ацетонитриле: системный пик – 1; примесь I – 2; примесь II – 3; диборнол – 4

специфичность, критерии пригодности хроматографической системы, линейность, правильность, воспроизводимость, предел обнаружения и предел количественного обнаружения [10, 11].

Специфичность (селективность) методики обеспечивает возможность достоверно определять количественное содержание каждой примеси в присутствии действующего вещества.

Для подтверждения специфичности использовали модельную смесь субстанции диборнола (1,0 мг/мл) и примесей (0,005 мг/мл) в ацетонитриле (рис. 1). Идентификация примеси I, II и диборнола подтверждалась совпадением времени удерживания анализируемых компонентов и стандартных образцов. На хроматограмме растворителя отсутствовали пики, мешающие определению анализируемых соединений. Пики примесных соединений хорошо разделяются между собой и с пиком диборнола. Они имеют следующие времена удерживания: примесь I – 2,40 ± 0,02 мин; примесь II – 5,45 ± 0,02 мин; диборнол – 11,40 ± 0,03 мин.

Для проверки *пригодности хроматографической системы* использовали раствор примеси I (0,005 мг/мл) и примеси II (0,005 мг/мл) в ацетонитриле. Расчет параметров хроматографической системы проводили для пиков *п*-крезола и 4-метил-2-изоборнилфенола на пяти хроматограммах, полученных в условиях анализа.

Подобранная хроматографическая система характеризуется высокой эффективностью, хорошей разрешающей способностью и воспроизводимостью. Для определения содержания примесей, когда пики очень отличаются по высоте, коэффициент разделения между пиками должен быть больше 2. Степень разделения системного пика, пиков примесей I и II, а также пика диборнола на хроматограмме больше 2. Коэффициент асимметрии пика примеси I составил 0,9, а примеси II – 1,5. Относительное стандартное отклонение площади пиков для примесей I и II равно 1 % .

Линейность методики отражает пропорциональность увеличения (уменьшения) площади пика на хроматограмме при возрастании (снижении) количества анализируемого вещества – посторонних примесей в испытуемых образцах субстанции диборнола. Определение линейности проводили на шести уровнях концентраций примеси I и примеси II

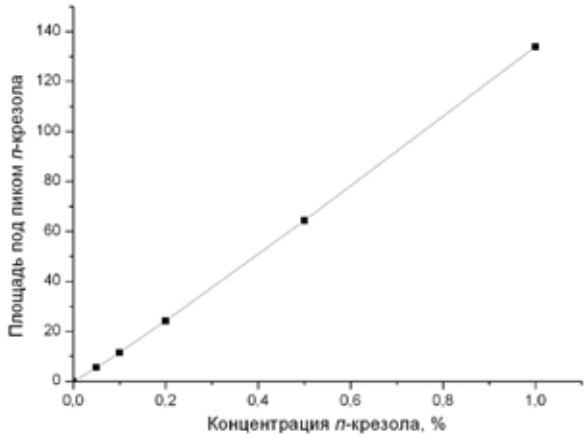


Рис. 2. Зависимость площади пика от содержания п-крезола в модельных смесях

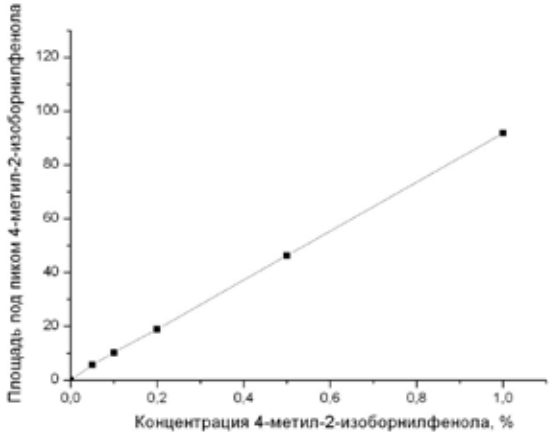


Рис. 3. Зависимость площади пика от содержания 4-метил-2-изоборнилфенола в модельных смесях

в ацетонитриле (0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5 и 1 %). Регламентированное содержание посторонних примесей в проекте ФСП на субстанцию диборнола составляет не более 0,2 %. В связи с этим охваченный нами диапазон концентраций примесей в растворах для проверки линейности считаем приемлемым. Каждый из шести полученных растворов примесей (I) и (II) хроматографировали не менее 3 раз. Рассчитывали среднее значение площадей пиков и строили кривую зависимости площади пика от концентрации вещества в растворе (рис. 2, 3). Коэффициент корреляции, который является критерием линейной зависимости между концентрацией и площадью пика, в обоих случаях составил 0,999, что говорит о соблюдении линейности в анализируемом диапазоне концентраций. Этот интервал можно определить как аналитическую область методики.

Правильность (точность) методики характеризует близость результатов испытаний, полученных в данных условиях, к истинному значению. Правильность данной методики установлена по результатам анализа трех параллельных определений модельных растворов на четырех уровнях концентраций примесей I и II. Согласно представленным данным (табл. 1, 2), методика обладает удовлетворительной точностью.

Воспроизводимость аналитической методики характеризует надежность анализа

Таблица 1. Оценка правильности методики для анализа примеси I

Содержание примеси I в растворе, мкг/мл		Отклонение (погрешность определения), %	Среднее отклонение, %
теоретическое	найденное		
0,50	0,48 0,46 0,46	4,0 8,0 8,0	6,7
1,00	1,07 0,98 1,05	7,0 2,0 5,0	4,7
2,00	2,13 2,12 2,12	6,5 6,0 6,0	6,2
5,00	5,38 4,50 4,71	7,6 10,0 5,8	7,8

Таблица 2. Оценка правильности методики для анализа примеси II

Содержание примеси II в растворе, мкг/мл		Отклонение (погрешность определения), %	Среднее отклонение, %
теоретическое	найденное		
0,50	0,59 0,43 0,40	18,0 14,0 20,0	17,3
1,00	1,02 1,09 1,14	2,0 9,0 14,0	8,3
2,00	2,10 2,12 2,12	5,0 6,0 6,0	5,7
5,00	5,13 4,96 5,20	2,6 0,8 4,0	2,5

по степени совпадения результатов индивидуальных определений при многократном использовании. В работе представлена внутрилабораторная воспроизводимость методики, которую оценивали при использовании модельного раствора с содержанием примесей I и II на уровне 0,5 % (0,005 мг/мл). Раствор последовательно 10 раз вводили в жидкостный хроматограф. На хроматограмме измеряли площади пиков примесей I и II. На основании полученных результатов (табл. 3) можно сделать заключение о хорошей воспроизводимости данной методики. Относительная ошибка среднего результата определения примесей I и II составляет 0,83 и 1,33 % соответственно.

Предел обнаружения – минимальное содержание анализируемого вещества в образце, которое можно обнаружить с помощью данной методики. В наших исследованиях это минимальная концентрация, при которой посторонние примеси могут быть достоверно обнаружены. Этот параметр определен исходя из соотношения аналитического сигнала к фоновому шуму (3:1). При данном соотношении предел обнаружения для примеси I и II составил 0,1 мкг/мл (0,01 %).

Таблица 3. Оценка воспроизводимости методики

№ опыта	Площадь пика примеси I	Площадь пика примеси II
1	62,8	44,8
2	63,1	45,5
3	63,2	47,1
4	62,0	47,4
5	62,2	46,3
6	62,2	45,3
7	63,0	46,6
8	62,9	47,1
9	63,6	46,1
10	64,4	46,5
$X_{ср}$	62,9	46,3
S	0,723	0,856
$\Delta X_{ср}$	0,52	0,61
$X_{ср} \pm \Delta X_{ср}$	62,9±0,52	46,3±0,61
$\varepsilon_{ср}$, %	0,83	1,33

Предел количественного обнаружения – концентрация, при которой посторонние примеси могут быть обнаружены с приемлемой точностью и воспроизводимостью. Соотношение аналитического сигнала к фоновому шуму для данного уровня концентрации должно составлять не менее 10:1. Предел количественного обнаружения для примеси I и II равен 0,5 мкг/мл (0,05 %).

Таким образом, методика количественного определения по валидационным характеристикам является специфичной для определения посторонних примесей в субстанции диборнола. Она характеризуется корректной точностью и воспроизводимостью результатов, линейной зависимостью в аналитической области от 0,01 до 1,0 % от основного вещества, принятого за 100 %.

Выводы

1. Разработана методика определения посторонних примесей в субстанции диборнола с помощью ВЭЖХ, валидация которой показала, что данная методика является специфичной, линейной, точной и воспроизводимой.

2. ВЭЖХ-методика определения посторонних примесей может быть использована в проекте фармакопейной статьи предприятия на субстанцию диборнола.

Список литературы

1. Плотников М.Б., Иванов И.С., Смольякова В.И., Чернышева Г.А., Кучин А.В., Чукичева И.Ю., Краснов Е.А. Антиоксидантная активность производного о-изоборнилфенола при ишемии головного мозга у крыс // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2010. – № 5. – С. 23-25.

2. Плотников М.Б., Смольякова В.И., Иванов И.С., Кучин А.В., Чукичева И.Ю., Краснов Е.А. Антитромбогенная и антитромбоцитарная активность производного *орто*-изоборнилфенола // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008. – Т. 145, № 3. – С. 296-300.

3. Плотников М.Б., Чернышева Г.А., Смольякова В.И., Иванов И.С., Кучин А.В., Чукичева И.Ю., Краснов Е.А. Нейропротекторные эффекты и механизмы действия диборнола при ишемии головного мозга // Вестник РАМН. – 2009. – № 11. – С. 12-17.

4. Жданкина А. А., Плотников М. Б., Смольякова В.И., Иванов И.С., Колосова Н.Г., Фурсова А.Ж., Кучин А.В., Чукичева И.Ю., Логвинов С.В. Морфологические аспекты применения полусинтетического антиоксиданта диборнола при инволюционной центральной хориоретинальной дегенерации у крыс OXYS // Бюллетень сибирской медицины. – 2009. – № 3. – С. 27-32.

5. ГОСТ 121007-76. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности М.: Госстандарт СССР, 1976. – 6 с.

6. Чукичева И. Ю., Кучин А. В. Природные и синтетические терпенофенолы // Российский химический журнал . – 2004. – Т. 48, № 3. – С. 21-37.

7. Вредные вещества в промышленности. Справочник для химиков, инженеров и врачей: В 3 т. Т.1 Органические вещества / Под ред. Н.В. Лазарева, Э.Н. Левиной. – 7-е изд., пер. и доп. – М.: Химия, 1976. – 592 с.

8. Вредные вещества в промышленности. Справочник для химиков, инженеров и врачей: В 3 т. Т.2. Органические вещества / Под ред. Н.В. Лазарева, Э.Н. Левиной. – 7-е изд., пер. и доп. – М.: Химия, 1976. – 624 с.

9. Иванов И. С. Связь структуры и токсичности в ряду произвольных изоборнилфенола // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической фармакологии: Материалы конф. / Под ред. В. В. Жданова. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2007. – С. 35-37.

10. Ghulam A. Shabir. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization // Journal of Chromatography A, 2003, V. 987, No 1-2, P 57–66.

11. Marcelo Ribani, Carol H. Collins, Carla B.G. Bottoli. Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole // Journal of Chromatography A, 2007, V. 1156, No 1-2, P 201-205.

Determination of Impurities in Dibornol Substance by HPLC

Elena E. Nazmutdinova[a], Efim A. Krasnov[a], Elena G. Strukova[b], Alexandr A. Efremov[b] and Maxim L. Belyanin[c]

[a] Siberian State Medical University, 2 Moskovsky, Tomsk, 634050 Russia

[b] Siberian Federal University, 79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041 Russia

[c] Tomsky Polytechnic University, 30 Lenina, Tomsk, 634034 Russia

The results of elaboration of procedure and suitability evaluation (validation) for the determination of impurities in dibornol (4-methyl-2,6-diisobornylphenol) substance have been presented. The validation was carried out at the stage of monographs of dibornol preparation.

Keywords: dibornol, 4-methyl-2,6-diisobornylphenol, HPLC, validation.