

УДК 615.2/3.07:544 174

АНАЛИЗ КРИСТАЛЛИЧЕСКОЙ И ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ.

И.Г. Смирнова, Г.Н. Гильдеева, В.В. Чистяков

(кафедра химии природных соединений; e-mail: sig@genebee.msu.su)

Изменение кристаллического состояния или оптической изомерии субстанции в значительной степени оказывает влияние на физико-химические, фармакотехнологические свойства и биодоступность лекарственных средств. Показано, что методы дифракции рентгеновских лучей на порошке (X-Ray Powder Diffraction), инфракрасной Фурье-спектроскопии, дифференциальной сканирующей калориметрии, оптической микроскопии, кругового дихроизма с успехом могут применяться для контроля качества лекарственных препаратов.

Ключевые слова: лекарственные препараты, полиморфизм лекарственных веществ, полиморфные модификации, определение, УФ-спектроскопия, оптическая изомерия, круговой дихроизм.

В нашей стране и за рубежом все большее внимание уделяется качеству лекарственных препаратов. В структуре мирового потребления лекарств основная часть (по некоторым оценкам – до 95%) приходится на готовые формы промышленного (или мелкосерийного аптечного) изготовления, а чистые субстанции практически совсем не употребляются [1]

Вместе с тем терапевтическая (клиническая) неэквивалентность при производстве дженериков (воспроизведенных лекарственных препаратов) во многом определяется их фармакокинетической неэквивалентностью, которая в свою очередь зависит от фармацевтических факторов.

Физико-химические свойства лекарственного вещества оказывают значительное влияние на его биологическую активность [2]. Химические соединения имеют различную структуру (координационное число, тип плотнейшей упаковки, мотив расположения катионов, поворот некоторых структурных групп в процессе полиморфного превращения, размеры и формы граней), характеризующуюся в каждом конкретном случае специфической совокупностью свойств. Все это приводит к различию внешней формы кристаллов – габитуса. Твердые вещества с близким габитусом называют *изоморфными*. Многие вещества способны существовать в более чем одной кристаллической форме, каждую из которых называют *полиморфной модификацией*, а само явление – *полиморфизмом*. Геометрическая форма и состав образующихся кристаллов существенно зависят от характера растворителя, скорости кристаллизации, температуры процесса, от наличия примесей, давления и др. факторов [3].

Полиморфные изменения лекарственных веществ могут стать причиной быстрой инактивации препаратов, изменения физических показателей готовых лекарств, химической несовместимости ингредиентов в одной и той же лекарственной форме. Полиморфные модификации ряда широко применяемых лекарственных веществ заметно различаются по химической стабильности, гигроскопичности, прессуемости. В зависимости от типа связей в кристалле, окружающих условий химической структуры они могут переходить в свои менее активные, стабильные аналоги.

Накоплено достаточное количество экспериментального материала о зависимости структуры веществ и их биологической доступности, позволяющего более детально рассмотреть взаимоотношения кристаллической решетки, конформации молекулы и биологической активности органического вещества не только в твердой фазе, но и в растворе.

Многие синтетические лекарственные препараты существуют в виде двух или нескольких пространственных изомеров. Фармакологическая активность рацемических лекарственных препаратов связана обычно с действием лишь одного энантиомера [4]. Второй или обладает менее выраженной активностью, или совсем не активен, или проявляет другие фармакологические эффекты.

В некоторых случаях количественные различия в биологической активности двух энантиомеров одного и того же соединения выражены очень сильно. Например, D-изомер изопротеренола – лекарственного препарата, применяемого при легких приступах астмы, действует как бронхорасширяющее средство в

50–70 раз активнее, чем L-изомер [1]. Распознавать стереоизомеры вводимого в организм вещества можно на разных стадиях: при связывании с ферментами и рецепторами, при транспортировке через мембраны, в процессах поглощения в клетках и распределения между тканями. Это подтверждают наблюдения за стереоизбирательным метаболизмом верапамила, применяемого при сердечных заболеваниях, во время его первого прохождения через печень. L-Изомер, который фармакологически в 8–10 раз активнее D-изомера, быстрее метаболизируется в печени. Значительные расхождения в биотрансформации энантиомеров приводят к тому, что их содержание в плазме крови различно. Отношение изомеров D и L в плазме равно пяти при пероральном (через рот) приеме верапамила и только двум при внутривенном введении, когда препарат попадает в кровоток, минуя печень. Этот факт в значительной степени объясняет большую разницу между оптимальными пероральными (80–160 мг) и внутривенными (5–10 мг) дозами верапамила [4].

Выявление фармакокинетических особенностей отдельных изомеров открывает перспективное направление совершенствования уже известных лекарственных средств. С практической точки зрения в настоящее время возрастает роль такой науки, как биофармация, изучающей биологическое действие лекарственных препаратов в зависимости от их физико-химических свойств, лекарственных форм. При этом необходимо использовать широкий спектр методов аналитической химии и физики (энантиомерный состав, полиморфизм, свойства кристаллов).

В работе рассмотрено применение ряда спектральных методов для контроля качества лекарственных соединений. Для анализов использовали субстанции и образцы препаратов верапамила различных производителей. По химическому строению верапамил может рассматриваться как усложненный вариант молекулы фенилалкиламинов: 5-[(3,4-диметоксифенэтил)-метиламино]-2-(3,4-диметоксифенил)-2-изопропилвалеронитрил гидроклорид [?]. Этот препарат является блокатором кальциевых каналов и используется в медицине при ишемической болезни сердца для профилактики приступов стенокардии.

Экспериментальная часть и обсуждение результатов

Дифракция рентгеновских лучей на порошке (X-Ray Powder Diffraction)

X-Ray Powder Diffraction (XRPD, дифракция рентгеновских лучей на порошке или метод дифрак-

ции рентгеновских лучей на образце из порошка) – уникальный инструмент для исследования поликристаллических материалов? он чрезвычайно полезен для характеристики твердых фармацевтических субстанций лекарственных веществ.

Несмотря на то что рентгеноструктурный анализ монокристалла обеспечивает реальное понимание кристаллической структуры, использование такого метода для рутинных исследований кристалличности фармацевтических субстанций затруднено вследствие длительности (необходимость вырастить монокристалл) процедуры и трудоемкости. Фактически, большинство веществ получено как микрокристаллические порошки, которые не содержат кристаллографически адекватные кристаллы. Вместе с тем для общей оценки вещества обычно достаточно установить его полиморфную форму и идентичность.

Поскольку полиморфизм и сольватоморфизм являются результатом кристаллографического феномена, X-Ray рентгеновская дифракция представляется достоверным методом оценки этих явлений. Вследствие своей простоты и информативности метод XRPD используется для контроля кристаллизации отдельных партий (скрининг) субстанций лекарственных веществ при их производстве на предмет полиморфизма и сольватоморфизма. Вместе с тем для подтверждения данных о кристалличности и полиморфизме одного метода XRPD недостаточно. Необходимо применять и другие подходы, такие как дифференциальная сканирующая калориметрия, твердотельный ЯМР (ядерно-магнитный резонанс) и др. [5]. На рис. 1 показан пример применения метода XRPD для оценки идентичности двух образцов субстанций верапамила. Рентгеновские дифрактограммы получены на приборе «X-Ray 3070E» Различий в спектрах X-Ray Powder Diffraction не выявлено.

Дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC, ДСК)

Термический анализ (термоанализ) и микрокалориметрия являются наилучшей техникой для определения термодинамической взаимосвязи между различными фазами: энантиотропным и монотропным переходами между реальным полиморфным состояниями вещества, переходами между различными сольватами или гидратами и полиморфами, переходами точки стеклования аморфных форм.

В научной литературе описано применение термоанализа и калориметрических методов для характеристики полиморфизма и сольватоморфизма более чем 300 активных ингредиентов лекарственных ве-

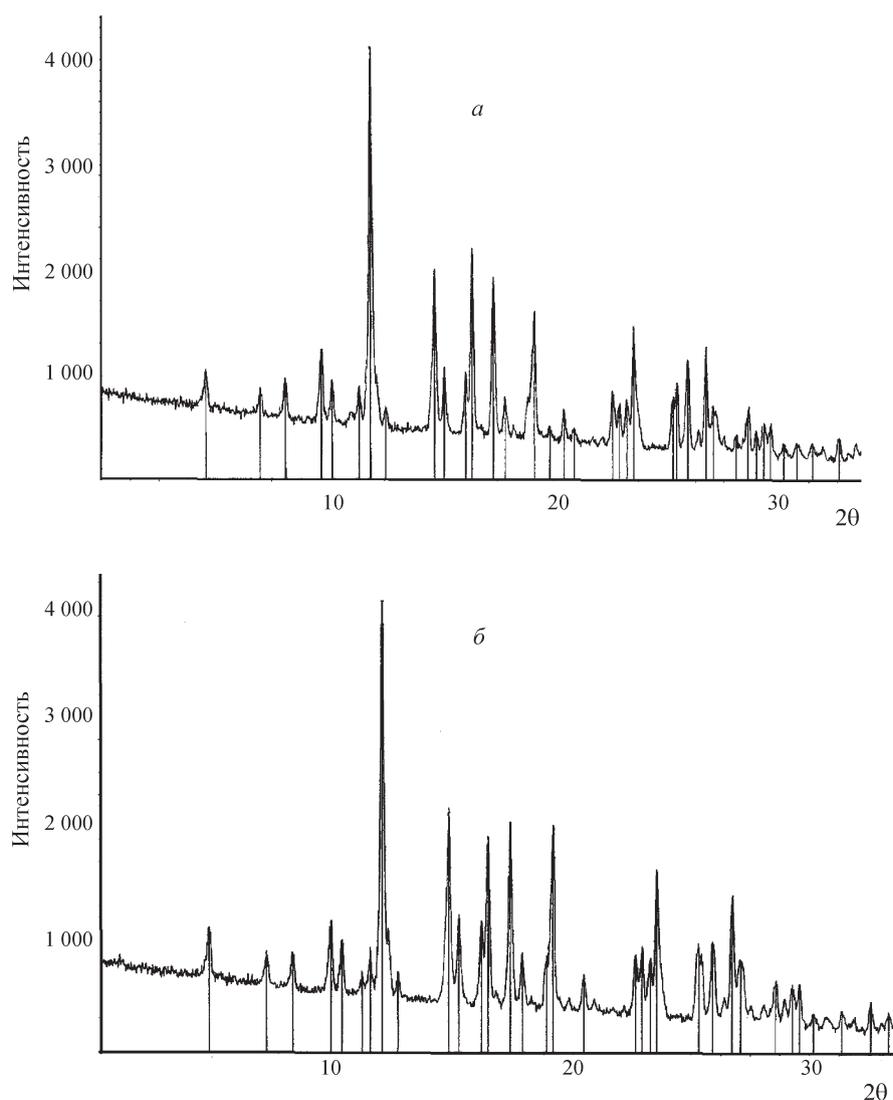


Рис. 1. X-Ray-спектры субстанций верапамила

ществ [6]. Ниже представлен ДСК-анализ двух образцов субстанций верапамила.

Для анализа образцов методом дифференциальной сканирующей калориметрии предварительно на термогравиметрическом анализаторе «TGA Q500» фирмы «TA Instruments» регистрировали кривую зависимости потери массы вещества от температуры. По кривой определяли диапазон температур, в котором целесообразно проводить анализ методом ДСК, т.е. от комнатной температуры до момента начала термического разложения образца. Анализ методом ДСК проводили на приборе «DSC Q100» фирмы «TA Instruments» при непрерывном продуве калориметрической ячейки воздухом с расходом 50 мл/мин в герметично закрытых чашечках из алюминия (с инвертированной крышкой для сокращения объема воздуха, запечатываемого вместе с образцом). Регистрацию кривых

проводили со скоростью нагревания $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ в режиме непрерывного линейного нагревания и по стандартной процедуре нагрев/охлаждение/нагрев по следующей программе: 1) линейный нагрев от комнатной конечной температуры со скоростью $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$; 2) линейное охлаждение до 0°C со скоростью $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$; 3) линейный нагрев от 0°C до конечной температуры со скоростью $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

Для образцов верапамила № 1 и № 2 конечная температура составляла 170°C . Для анализа использовали образцы массой от 2 до 8 мг. Регистрацию данных и обработку кривых проводили с помощью пакета программного обеспечения прибора «DSC Q100 TA Instruments Thermal Advantage» (версия 4.3). Результаты термоанализа образцов верапамила представлены на рис. 2–5. Для образцов верапамила № 1 и № 2 кривые первого нагрева показали существенные различия

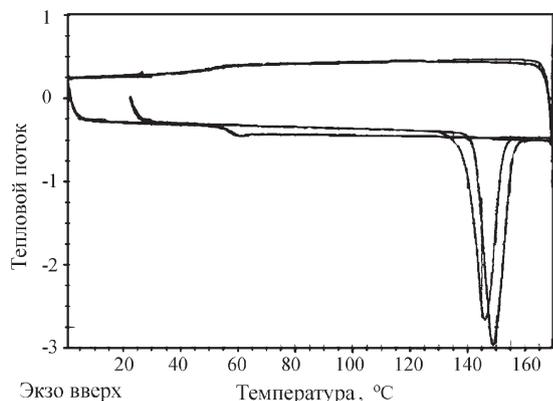


Рис. 2. ДСК-кривые верапамила № 1 и № 2

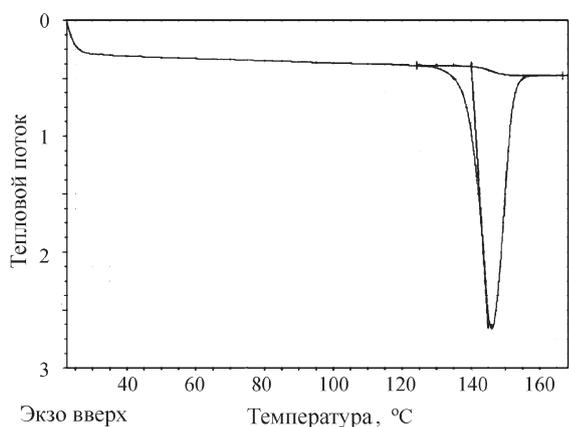


Рис. 3. Образец верапамила № 1 (первое нагревание)

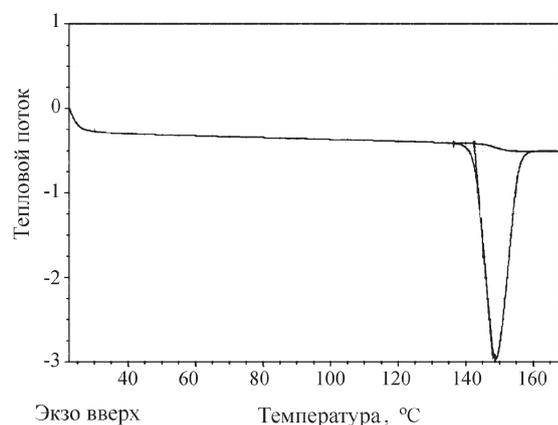


Рис. 4. Образец верапамила № 2 (второе нагревание)

пика плавления (отличалась и температура и теплота плавления вещества). При последующем охлаждении образцов со скоростью $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ кристаллизации вещества не происходит, о чем свидетельствует отсутствие пика кристаллизации на кривой охлаждения и ярко выраженный переход стеклования на кривой повторного нагревания. Отсутствие пика плавления на кривой повторного нагревания показывает, что

при застывании верапамил не кристаллизуется, а образует чистую аморфную форму [7]. Таким образом, различие кривых нагревания отражает различия в методике синтеза или очистки вещества (по-видимому, перекристаллизации) и, возможно, в степени чистоты конечного верапамила.

Инфракрасная спектроскопия (IR-анализ)

Инфракрасная спектроскопия (ИК-спектроскопия) – раздел молекулярной оптической спектроскопии, изучающий спектры поглощения и отражения электромагнитного излучения в ИК-области, т.е. в диапазоне длин волн от 10^{-6} до 10^{-3} м. В координатах интенсивность поглощенного излучения – длина волны (или волновое число) ИК-спектр представляет собой сложную кривую с большим числом максимумов и минимумов. Полосы поглощения появляются в результате переходов между колебательными уровнями основного электронного состояния изучаемой системы. Спектральные характеристики (положения максимумов полос, их полуширина, интенсивность) индивидуальной молекулы зависят от массы составляющих ее атомов, геометрического строения, особенностей межатомных сил, распределения заряда и др. Поэтому ИК-спектры отличаются большой индивидуальностью, что и определяет их ценность при идентификации и изучении строения соединений. Для регистрации спектров используют классические спектрофотометры и фурье-спектрометры. Достоинства фурье-спектрометра: высокое отношение сигнал:шум, возможность работы в широком диапазоне длин волн без смены диспергирующего элемента, быстрая (за секунды и доли секунд) регистрация спектра, высокая разрешающая способность (до $0,001\text{ см}^{-1}$).

Спектры регистрировали на инфракрасном Фурье-спектрометре «Nicolet 380», снабженном при-

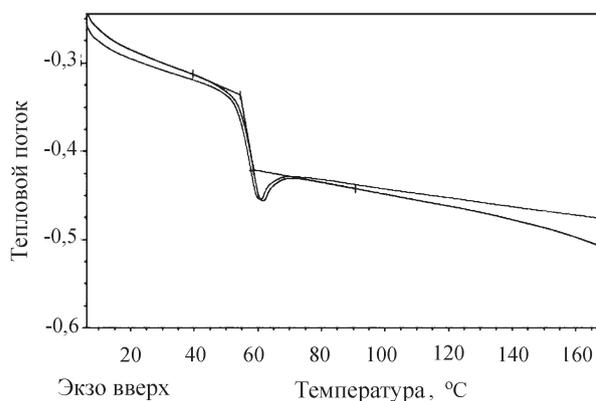


Рис. 5. Образцы верапамила № 1 и № 2 (первое нагревание)

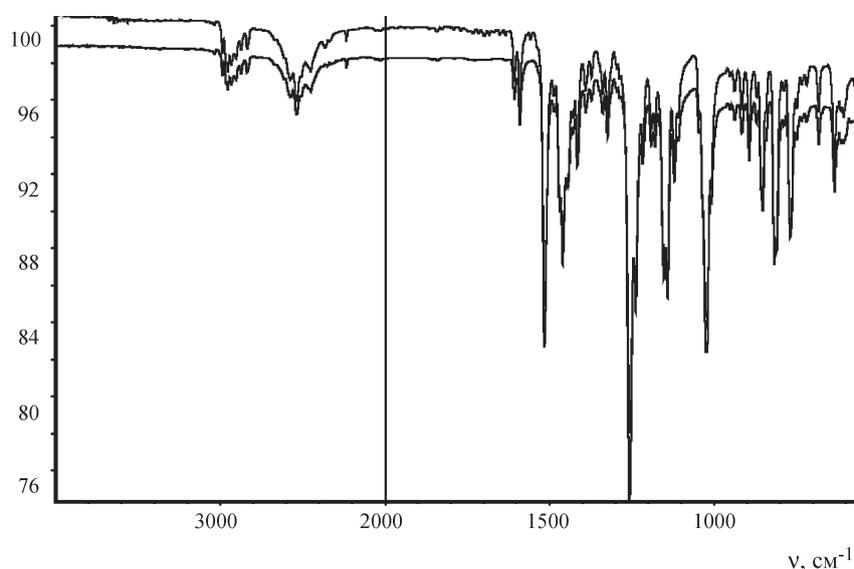


Рис. 6. ИК-спектры субстанций верапамила № 1 и № 2

ставкой однократного нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) «*Smart Performer*». Спектральное разрешение 4 см^{-1} , диапазон $4000\text{--}500 \text{ см}^{-1}$, общее время регистрации каждого спектра 1 мин. Управление спектрометром осуществлялось с помощью программы OMNIC 7.3, установленной на компьютере, подключенном к спектрометру. На рис. 6 представлены ИК-спектры двух кристаллических образцов субстанций верапамила.

Анализ полученных спектров позволяет сделать вывод о практически полном совпадении друг с другом спектров двух образцов верапамила. Совпадают положения полос поглощения и их относительные интенсивности. Вместе с тем, небольшое расхождение в общей интенсивности спектра вызвано, по всей видимости, различиями в кристаллической форме сравниваемых образцов.

Оптическая микроскопия

Оценить (сравнить) кристаллическое состояние, морфологию и размерность твердых субстанций лекарственных веществ можно, используя метод оптической микроскопии. Это важно, особенно при воспроизведении химического синтеза субстанций лекарственных веществ, так как от размера кристаллов и их морфологии зависит скорость растворения, которая влияет на скорость всасывания лекарства из желудочно-кишечного тракта. Даже при 400–1000-кратном увеличении можно оценить подобие качества субстанции воспроизведенного препарата субстанции, производимой фирмой-инноватором. На рис. 7 показаны фотографии двух типов субстанций

верапамила. Видно, что сравниваемые субстанции различаются по размеру кристаллов.

Таким образом, проведенные анализы показали, что техника *X-Ray powder diffraction*, инфракрасная Фурье-спектроскопия, дифференциальная сканирующая калориметрия, оптическая микроскопия могут с успехом применяться для контроля качества твердых кристаллических субстанций, причем в качестве образца сравнения необходимо использовать субстанцию вещества фирмы-инноватора.

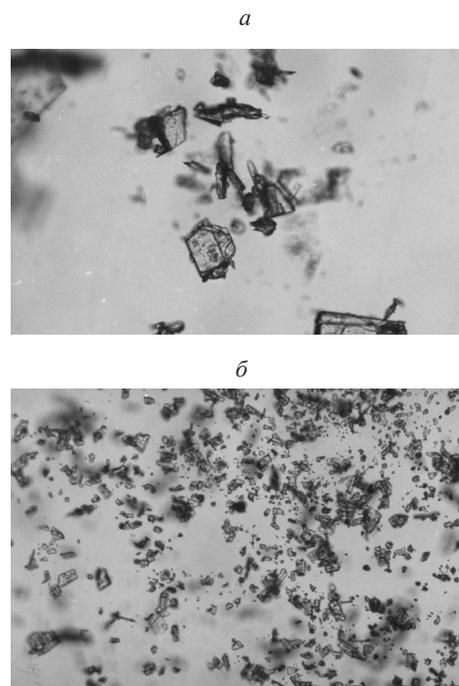


Рис. 7. Фотографии образцов субстанций верапамила при 400-кратном увеличении

Круговой дихроизм (КД)

Для изучения веществ, обладающих оптической изомерией широко используется метод кругового дихроизма (КД). С помощью этого метода измеряют в зависимости от длины волны способность оптически активного хромофора по разному поглощать свет поляризованный по кругу вправо и влево [8, 9].

С помощью метода кругового дихроизма (КД) можно дифференцировать вклады в суммарную оптическую активность отдельных полос поглощения изучаемых изомеров. Экспериментальные спектры КД визуально сравнивают с реперными спектрами КД, полученными для гипотетических структур L- и D-конфигураций. Таким образом, получают качественную и количественную картину состава изучаемой субстанции. Большим преимуществом метода КД является его высокая чувствительность. Для анализа в отдельных случаях можно ограничиться сотыми долями миллиграмма субстанции.

Круговой дихроизм образцов верапамила.

Из всех образцов были приготовлены растворы одинаковой концентрации для дальнейшего исследования их методами УФ-спектроскопии и кругового дихроизма. Концентрация растворов такова, что оптическая плотность при длине волны 275 нм (максимум поглощения молекулы верапамила) составляет $\sim 1,0 \pm 0,2$.

УФ- спектры (рис. 8) снимали на автоматическом спектрофотометре фирмы «Hitachi» (Япония) в интервале длин волн 200–400 нм. Для измерения использовали 1 см кварцевые кюветы. КД-спектры (рис. 9) снимали на автоматическом дихрографе фирмы «Yobin Yvon Mark» (Франция) интервал длин волн 220–400 нм, шкала чувствительности 1×10^{-5} . Для измерений использовали кварцевые кюветы, специально предназначенные для измерения КД.

Как видно из рис. 8, молекула верапамила имеет в УФ-спектре максимумы поглощения при $\lambda = 230$ нм и $\lambda = 280$ нм, что характерно для хромофоров верапамила.

Анализ полученных данных УФ-спектроскопии и кругового дихроизма показывает, что на кривых кругового дихроизма всех исследуемых субстанций

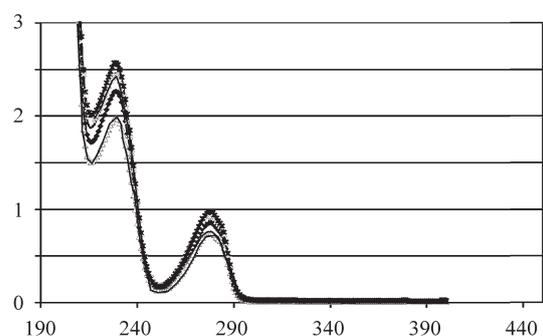


Рис. 8. УФ-спектры: 1, 2, 3 – субстанции верапамила; 4, 5 – препараты верапамила фармацевтических фирм

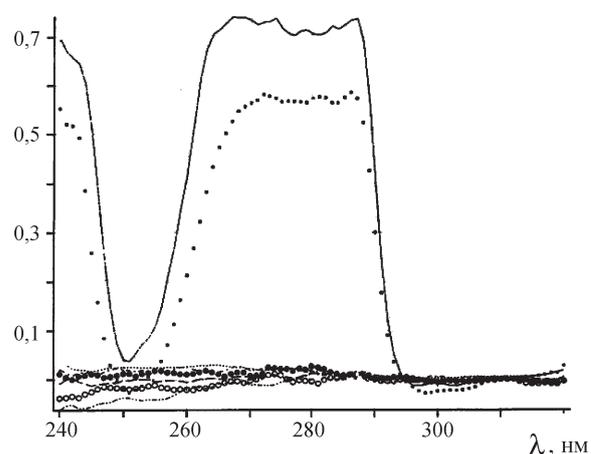


Рис. 9. Спектры кругового дихроизма R⁺ верапамил 1 – верапамил 1, 2 – верапамил 3 – верапамил 3, 4 – верапамил 4

и образцов верапамила отсутствуют эффекты Коттона в области поглощения хромофора верапамила при длине волны 280 нм. Следовательно, все изученные образцы оптически не активны т.е. представляют собой рацематы. На спектре кругового дихроизма оптически активной R⁺-формы четко проявляется эффект Коттона (максимум на кривой КД) при длине волны 280 нм.

Таким образом, с помощью методов кругового дихроизма быстро и высокоэффективно анализируется смесь оптических изомеров биологически активных веществ. Этот метод может быть рекомендован для контроля качества лекарственных препаратов. Определение фармакокинетических особенностей отдельных изомеров открывает пути совершенствования лекарственных средств.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Мешковский А.П. // Фарматека, 2000. 37. № 1. С.29.
Демченкова Е.Ю.; Чистяков В.В. // Биомедицина. 2006. № 5. С.22.

Бернштейн Д. // Полиморфизм молекулярных кристаллов. М., 2007.
Алексеев В.В. // Соросовский образовательный журнал. 1998. № 1. С.49.

- Byrn S, Pfeiffer R, Ganey M, // Pharm. Res.* 1995. 12. N 7. P. 945.
- Giron D. // J. Therm. Anal. and Calorimetry.* 2001. 64. P.37.
- Гильдеева Г.Н., Чистяков В.В., Демченкова Е.Ю., // Химико-фармацевтический журнал.* 2010. № 1. С. 39
- Кантор Ч., Шиммель П. // Биофизическая химия.* М., 1984. 2. С. 63.
- Сердюк И., Заккаи Н., Заккаи Дж. // Методы в молекулярной биофизики. Структура. Функция. Динамика.* Т. 2. М., 2010.
- Маиковский М.Д. // Лекарственные средства.* Т. 2. 1984. С. 427.
- British Pharmacopoeia.: Medicinal and Pharmaceutical substances.* Vol. 1. 2001. С. 1.

Поступила в редакцию 20.03.12

ANALYSIS OF CRYSTALLINE STRUCTURE AND CHIRALITY OF DRUG SUBSTANCES

I.G. Smirnova, G.N. Gildeeva, V.V. Chistyakov

(Department of Chemistry of Natural Products)

The change in substance's crystalline state or chirality influence on physical and chemical, pharmacotechnological features as well as bioavailability of pharmaceuticals. It was identified that such methods as X-Ray Powder Diffraction, infrared Fourier transform spectroscopy, differential scanning calorimetry, optical microscopy, circular dichroism can be successfully used for quality control of medical preparation.

Key words: *drugs, polymorphism of drug substances, polymorphic modification, assay, UV-spectroscopy, optical isomerism, circular dichroism.*

Сведения об авторах: *Смирнова Инна Григорьевна* – ст. науч. сотр., кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ, канд. хим. наук, доцент (sig@genebee.msu.ru); *Гильдеева Гэлия Нязыфовна* – доцент факультета экономики и управления Первого московского медицинского университета, канд. биол. наук, доцент; *Чистяков Виктор Владимирович* – зав. сектором фармакокинетики Центра по химии лекарственных средств, докт. фарм. наук.

Уточните подпись к рис. 9, обозначьте кривые