
УДК 543.51, 543.544, 543.054.

**НОВЫЙ ПОДХОД К СОПОСТАВЛЕНИЮ ОРИГИНАЛЬНЫХ
ФАРМПРЕПАРАТОВ И ДЖЕНЕРИКОВ, ОСНОВАННЫЙ
НА СРАВНЕНИИ МНОГОМЕРНЫХ ПРОФИЛЕЙ ПРИМЕСЕЙ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СФЭ, ЖЭ
И ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

**А.И. Ревельский, И.Н. Глазков, Ю.С. Яшин, Д.А. Чепелянский,
А.С. Самохин, Д.А. Бурмыкин, И.А. Ревельский***

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,
Москва, Россия*

*revelsky@environment.chem.msu.ru

Поступила в редакцию 25.10.2010 г.

Изучена возможность сравнения оригинальных фармпрепаратов и их аналогов («дженериков») на основе сопоставления многомерных профилей примесей, выделенных из образцов методами сверхкритической флюидной экстракции и жидкостной экстракции и зарегистрированных с помощью газовой хромато-масс-спектрометрии с электронной ионизацией (ЭИ) и фотохимической ионизацией при атмосферном давлении (ФХИАД). Показано, что использование предложенного способа анализа всего концентратата из органического экстракта позволяет существенно увеличить число зарегистрированных примесей. Предложенный подход позволяет определить аутентичность исследуемых образцов фармпрепаратов, а также провести сопоставление качества оригинальных фармпрепаратов и дженериков.

Ключевые слова: примеси в фармпрепаратах, дженерики, ГХ/МС, реакционная ГХ/МС, сверхкритическая флюидная экстракция, жидкостная экстракция, масс-спектрометрия с фотохимической ионизацией при атмосферном давлении.

ВВЕДЕНИЕ

К оригинальным фармпрепаратам (оригиналам) относятся запатентованные препараты, которые испытаны на основное действие и побочные эффекты на тысячах больных и добровольцев, прошли все исследования на содержание примесей и активного вещества при использовании общепринятых методов контроля и для которых изучены фармакокинетика, биодоступность и стабильность при хранении. Дженирики, согласно общепринятому мнению, — это копии оригиналов (с точки зрения присутствия одного и того же активного вещества). В связи с этим в них контролируется в основном только содержание активного вещества и реже — нескольких примесей, биодоступность (растворимость препарата во времени при определенном pH водного раствора), редко (так как не является обязательным) проводится сопоставление кривых фармакокинетики (биоэквивалентность) для оригинала и дженериков при использовании малой группы добровольцев (18 чел.) и еще реже — сопоставление терапевтической эффективности оригинала и дженериков. При сопоставлении составов примесей принимают во внимание компо-

ненты, содержание которых не менее 0,05—0,10 %; для этих примесей желательно проведение идентификации. Однако такое сопоставление чаще всего проводится при использовании высокоеффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и совсем редко — сочетания ВЭЖХ с масс-спектрометрией (ВЭЖХ/МС). При анализе субстанций и фармпрепаратов используют растворы, полученные после растворения субстанций в определенном растворителе, либо экстракты из фармпрепаратов в том же растворителе. В соответствии с общепринятым мнением об эквивалентности оригиналов и дженериков правительства многих стран уделяют большое внимание замене оригиналов дженериками, так как последние много дешевле (в 2—4 раза). Число и состав примесей, присущих оригиналу и дженерикам, существенно различаются между собой. В связи с тяжелыми побочными эффектами (вплоть до летальных), наблюдающимися чаще для дженериков, актуальным является сопоставление профилей примесей, зарегистрированных различными методами для обоих препаратов.

Цель настоящего исследования — разработка методологии сопоставления качества оригинальных фармпрепаратов и дженериков, основанной на сравнении многомерных профилей примесей, содержащихся в этих препаратах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методы исследования

В работе использованы следующие методы исследования:

- сверхкритическая флюидная экстракция (СФЭ) без использования растворителя с переводом всего концентрата (а не малой его части — 0,001÷0,01) в аналитический прибор термодесорбцией [1];
- жидкостная экстракция (различными растворителями) с последующим сорбционным концентрированием анализаторов из потока сформированной парогазовой смеси и переводом всего их концентрата, свободного от растворителя, в аналитический прибор термодесорбцией [2].

Анализ всего концентрата, выделенного СФЭ и ЖЭ, проводили методами газовой хромато-масс-спектрометрии с электронной ионизацией (ГХ/МС (ЭИ)), хромато-масс-спектрометрии с фотохимической ионизацией при атмосферном давлении (ГХ/МС (ФХИАД)), реакционной ГХ/МС (ЭИ, химическая ионизация — ХИ), реакционной ГХ/МС (ФХИАД).

Оборудование и методика эксперимента

Работу проводили при использовании следующего оборудования: хромато-масс-спектрометры фирмы Agilent модели «5973N» в сочетании с газовым хроматографом модели «6890N», фирмы Thermo Scientific модели «DSQ» в сочетании с газовым хроматографом модели «Trace GC Ultra» и фирмы Leco модели «TruTOF» в сочетании с газовым хроматографом фирмы Agilent модели «7890A». Кроме того, в работе был использован хромато-масс-спектрометр модели «4021» фирмы Finnigan с источником фото- и фотохимической ионизации при атмосферном давлении [3]. Этот источник ионизации обеспечивал возможность регистрации масс-спектров компонентов, состоящих только из одного молекулярного (M^+) либо двух ионов (M^+ и MH^+). Разделение проводили при использовании капиллярных колонок фирмы Restek модели «RTX-1MS» длиной 30 м, внутренним диаметром 0,32 мм и толщиной неподвижной фазы 0,25 мкм и программируя-

ния температуры термостата колонок. Температурный диапазон и скорость программирования температуры выбирали в каждом конкретном случае, так как состав анализируемых смесей, как правило, не был известен. Ввод пробы раствора (экстракта) проводили в режимах без деления и с делением потока. Объем жидкой пробы составлял 1 мкл. В случае концентрирования примесей из продукта с использованием СФЭ (в отсутствие органического растворителя) концентрат переводили в прибор ГХ/МС из картриджа с сорбентом термодесорбией в потоке гелия [1].

СФЭ осуществляли с использованием установки модели «SFC-300» фирмы Carlo Erba после оптимизации условий экстракции примесей. В качестве экстрагента использовали сверхкритический (СК) CO₂ (чистота 99,995 %). Навеска образца не превышала 0,1 г. Картридж заполняли комбинированным сорбентом, состоящим из сверхтонкого кварцевого волокна и сорбента Tenax TA 60/80 (Supelco, США). Жидкостную экстракцию из образцов субстанций и фармпрепаратов проводили при использовании соответствующего растворителя (указанного в фармакопее) после предварительного измельчения таблеток (либо кристаллических веществ) и их растирания. В ряде случаев экстракцию примесей из полученного порошка проводили растворителем, не растворяющим основной компонент, и выделение примесей из полученного экстракта осуществляли сорбцией из потока парогазовой смеси, сформированной из потока элюента и инертного газа, и проводили перевод всего концентрата аналитов термодесорбией в потоке газоносителя в отсутствие растворителя [2]. Навеска образца не превышала 1,5 мг. Ионизацию компонентов смесей осуществляли электронным ударом (энергия ионизирующих электронов — 70 эВ). Диапазон сканирования 100 ÷ 600 а.е.м. Скорость сканирования масс-спектров при использовании квадрупольного масс-анализатора — 2 скана/с, а времяпролетного — 20 сканов/с. При вводе жидких проб объем пробы составлял от 1 до 500 мкл (в зависимости от экстракта).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Признаками примесей, выделенных из исследованных фармпрепаратов, были: времена удерживания компонентов при регистрации суммарного тока с электронной ионизацией (ГХ/МС/ЭИ), масс-спектры электронной ионизации (ЭИ), интенсивность пика, зарегистрированного в режиме регистрации суммарного ионного тока (ЭИ), масс-спектры химической ионизации (ГХ/МС/ХИ), масс-хроматограммы, зарегистрированные для ГХ/МС (ФХИАД), и интенсивности соответствующих пиков, масс-спектры ФХИАД, времена удерживания компонентов, зарегистрированные при использовании реакционной ГХ/МС (ЭИ, ХИ, ФХИАД), и соответствующие масс-спектры. В таблице 1 приведены данные по числу зарегистрированных летучих органических соединений.

Как видно из приведенных в таблице 1 данных, число примесей, зарегистрированных в одном из дженериков (3-1) оригинала I (3-0), значительно меньше (82), чем в оригинале (95). Во втором дженерике (3-2) число легколетучих примесей (132) больше, чем в дженерике (3-1) и оригинале (3-0). По числу зарегистрированных примесей эти фармпрепараты можно расположить в следующей последовательности: (3-1) < (3-0) < (3-2). Оценка суммарного содержания соответствующих примесей составляла от 10⁻⁶ до 0,1 %.

В случае продукта II наименьшее число примесей (58) зарегистрировано в оригинальном фармпрепарате (2-0) и наибольшее (121) — в дженерике (2-1).

Таблица 1

Результаты ГХ/МС определения числа летучих органических соединений, выделенных СФЭ из кодированных оригинальных фармацевтических препаратов и соответствующих дженериков, поставленных институтом Росздравнадзора

Фармацевтический продукт	Код	Число зарегистрированных примесей
Продукт I (оригинал)	3-0	95
Продукт I (дженерик)	3-1	82
Продукт I (дженерик)	3-2	132
Продукт II (оригинал)	2-0	58
Продукт II (дженерик)	2-1	121
Продукт II (дженерик)	2-2	90

Таблица 2

Результаты ГХ/МС определения числа среднелетучих примесей, выделенных методами СФЭ и ЖЭ из проб оригинальных фармацевтических препаратов, поставленных институтом Росздравнадзора и зарегистрированных с использованием ГХ/МС/ЭИ

Фармацевтический продукт	Код	Число зарегистрированных примесей	
		СФЭ/ГХ/МС	ЖЭ/ГХ/МС*
Продукт I (оригинал)	3-0	95	37
Продукт II (оригинал)	2-0	63	32

* Проба жидкого экстракта — 1 мкл.

Диапазон суммарного содержания примесей составил от 0,15 % до 0,36 % в зависимости от продукта.

Число среднелетучих примесей, выделенных методами СФЭ и ЖЭ из проб оригинальных фармацевтических препаратов, поставленных институтом Росздравнадзора и зарегистрированных с использованием ГХ/МС (ЭИ), приведено в таблице 2.

Из данных, приведенных в таблице 2, видно, что число примесей, зарегистрированных с использованием СФЭ/ГХ/МС (ЭИ), существенно больше, чем в случае ЖЭ/ГХ/МС (ЭИ). Это различие может быть объяснено как более высокой полнотой извлечения в случае СФЭ, так и меньшей величиной анализируемой пробы в случае ЖЭ/ГХ/МС. Необходимо отметить, что экстракты, полученные методами СФЭ и ЖЭ, отличались не только по числу, но и по составу зарегистрированных примесей.

В таблице 3 приведено число среднелетучих примесей, выделенных с использованием ЖЭ и зарегистрированных в препаратах (3-0), (3-1) и (3-2) и препаратах (2-0), (2-1) и (2-2) с использованием ГХ/МС (ФХИАД).

Из таблицы 3 видно, что число среднелетучих примесей, зарегистрированных в случае оригинала (3-0) и дженериков (3-1) и (3-2), было примерно одинаковым, так же как и диапазон зарегистрированных молекулярных масс (168–434). В случае же продукта II число примесей, зарегистрированных в оригинале (2-0), несколько меньше, чем в дженериках (2-1) и (2-2), и, что существенно, наблюдается различие в диапазонах молекулярных масс примесей, зарегистрированных для этих продуктов.

Новый подход к сопоставлению оригинальных фармпрепаратов и дженериков, основанный на сравнении многомерных профилей примесей с использованием СФЭ, ЖЭ и ...

Таблица 3

Число среднелетучих примесей, выделенных ЖЭ из кодированных проб оригинальных фармацевтических препаратов, поставленных институтом Росздравнадзора и зарегистрированных с использованием ГХ/МС (ФХИАД)*

Фармацевтический продукт	Код	Число зарегистрированных примесей	Диапазон зарегистрированных молекулярных масс примесей, а.е.м
Продукт I (оригинал)	3-0	85	168÷434
Продукт I (дженерик)	3-1	86	168÷434
Продукт I (дженерик)	3-2	86	168÷434
Продукт II (оригинал)	2-0	23	226÷426
Продукт II (дженерик)	2-1	27	166÷408
Продукт II (дженерик)	2-2	26	188÷494

* Проба жидкого экстракта — 1 мкл.

Таблица 4

Результаты ГХ/МС (ЭИ) определения числа среднелетучих органических примесей, выделенных СФЭ и ЖЭ из фармпрепаратов

Фармпрепарат	ЖЭ/ГХ/МС	СФЭ/ГХ/МС
I	3	24
II	7	40
III	6	24
IV	8	52
V	9	38
VI	10	16
VII	7	26

В таблице 4 приведены данные по определению числа среднелетучих примесей, зарегистрированных в экстрактах, выделенных ЖЭ и СФЭ, методом ГХ/МС (ЭИ) в семи различных фармпрепаратах. Диапазон содержаний примесей, выделенных методом ЖЭ, составлял от 10^{-4} до $10^{-2}\%$, а выделенных СФЭ — $10^{-6} \div 10^{-2}\%$ (в случае ЖЭ анализировали малую часть экстракта — 1 мкл, а в случае СФЭ — весь концентрат аналитов).

Число примесей, зарегистрированных с использованием СФЭ/ГХ/МС (ЭИ), существенно превышает число примесей, зарегистрированных с использованием ЖЭ/ГХ/МС (ЭИ), однако их составы не совпадают, что говорит о необходимости совместного использования данных.

Нами было проведено сопоставление числа среднелетучих примесей, зарегистрированных в одном и том же фармацевтическом препарате, выпускаемом двумя отделениями одной и той же фирмы в разных странах, и в соответствующей фармацевтической субстанции при использовании СФЭ/ГХ/МС (ЭИ) и ЖЭ/ГХ/МС (ФХИАД) (см. таблицу 5).

Таблица 5

Число среднелетучих примесей, зарегистрированных при использовании СФЭ/ГХ/МС (ЭИ) и ЖЭ/ГХ/МС (ФХИАД) в одном и том же фармацевтическом препарате, выпускаемом двумя отделениями одной и той же фирмы в разных странах, и в соответствующей фармацевтической субстанции

Фармацевтический продукт	Число зарегистрированных примесей	
	СФЭ/ГХ/МС	ЖЭ/ГХ/МС (ФХИАД)
Образец, предоставленный FDA	107	84
Соответствующая фармацевтическая субстанция (FDA)	27	74
Тот же продукт, купленный в московской аптеке	59	70

Таблица 6

Число примесей, зарегистрированных в оригинальном препарате и его дженериках при анализе МТБЭ экстракта и реакционной смеси методом ГХ-МС

Фармпрепарат	Количество примесей	
	Экстракция	Дериватизация
Оригинал	11	28
Дженерик 1	16	35
Дженерик 2	11	15

Диапазоны содержаний примесей — от 10^{-7} до $10^{-2}\%$. Диапазоны молекулярных масс примесей, зарегистрированных в рассматриваемых в таблице 5 фармпродуктах и субстанции, составляли $162 \div 353$, $162 \div 265$ и $168 \div 353$ соответственно, что свидетельствует о некоторой общности и в то же время различии составов примесей.

Для одного оригинального препарата и двух дженериков было проведено со-поставление числа зарегистрированных среднелетучих примесей и trimetilси-лильных производных малолетучих примесей, выделенных жидкостной экстрак-цией из фармпрепаратов. Соответствующие данные приведены в таблице 6.

Как видно из таблицы 6, наименьшее суммарное число зарегистрированных примесей (экстрагированных и производных) содержится в дженерике 2.

Нами был изучен состав примесей, выделенных жидкостной экстракцией (с высыпыванием) из водной фракции одного оригинального фармпрепарата и четырех дженериков и зарегистрированных с использованием ГХ/МС (ЭИ) (с времяпро-летным масс-анализатором). В этом случае объем анализируемой пробы экстракта составлял 10 мкл (концентрирование анализаторов с удалением органического экстрагента и ввод всего концентрата анализаторов в ГХ/МС осуществляли в соотвествии с разработанным способом, описанным в работе [2]). Использование про-грамммы Chroma TOF для автоматического поиска компонентов позволило обна-ружить большее число примесей (по сравнению с ручной обработкой данных). Полученные данные приведены в таблице 7.

Исследуемые фармацевтические продукты по числу зарегистрированных средне-летучих примесей могут быть расположены в следующий ряд: оригинал < джене-рик 2 < дженерик 3 < дженерик 4 < дженерик 1.

Новый подход к сопоставлению оригинальных фармпрепаратов и дженериков, основанный на сравнении многомерных профилей примесей с использованием СФЭ, ЖЭ и ...

Обычный подход к изучению состава примесей в фармацевтических субстанциях основан на растворении навески субстанции растворителем, растворяющим активные вещества, и анализе малой части раствора соответствующим методом (чаще всего — ВЭЖХ). Одна из целей настоящего исследования — изучение возможностей применения ГХ/МС (ЭИ, ФХИАД) для сопоставления качества оригинальных фармпрепаратов (субстанций) и соответствующих дженериков на основании зарегистрированного числа примесей для каждого из продуктов. Анализ примесей в фармсубстанциях (фармпрепаратах) представляет большие трудности для хроматографии в связи с тем, что концентрация активного вещества на многие порядки превышает концентрации примесей.

Нами была изучена возможность увеличения селективности выделения примесей из фармсубстанций за счет использования экстрагента, не растворяющего основной компонент (активное вещество), и возможность увеличения числа зарегистрированных примесей за счет концентрирования анализов из органического экстракта и анализа всего концентрата (см. [2]).

Примеси, зарегистрированные в фармсубстанции препарата дротаверин при использовании обычного подхода и предложенного нами, приведены в таблицах 8 и 9

Таблица 7

Число среднелетучих примесей, зарегистрированных в исследуемых фармацевтических продуктах при использовании ГХ/МС (ЭИ) с времепролетным масс-анализатором

Фармацевтический продукт	Оригинал	Дженерик 1	Дженерик 2	Дженерик 3	Дженерик 4
Число зарегистрированных примесей	~60	~400	~90	~250	~350

Таблица 8

Примеси, зарегистрированные при анализе экстракта из навески дротаверина метанолом, растворяющим активное вещество. Объем пробы 1 мкл

№	Время удерживания, $t_{уд}$, мин	Масс-спектр (ЭИ)
1	17,18	123, 151, 179(100), 214
2	29,90	310, 321, 338, 352, 366(100), 380, 394(70), 395, 396
3	37,70	282, 294, 324(20), 338(20), 366(30), 395(100)

Таблица 9

**Примеси, зарегистрированные при анализе экстракта из навески дротаверина метилтретбутиловым эфиром, не растворяющим активное вещество.
Объем пробы 500 мкл**

№	Время удерживания, $t_{уд}$, мин	Масс-спектр (ЭИ)
1	11,52	77(90), 79(70), 91(50), 105(100), 123(50)
2	12,45	110(100), 166(85)
3	13,97	78, 124, 152, 180(70)

Окончание таблицы 9

№	Времена удерживания, $t_{уд}$, мин	Масс-спектр (ЭИ)
4	15,50	130
5	17,12*	123, 151, 179(100), 214
6	20,01	106(10), 134(20), 162(40), 190(35), 219(100), 220(60), 260(10)
7	28,06	245, 263, 280(100), 338, 352, 366
8	28,41	185(100)
9	29,99*	310, 321, 338, 352, 366(100), 380, 394(70), 395, 396
10	30,76	192(100)
11	32,59	298, 326, 338, 354(40), 366(100), 383, 412(20)
12	34,27	280, 296, 309, 324, 338(60), 352(50), 364(75), 366(70), 380(100), 410(60)
13	37,71*	282, 294, 324(20), 338(20), 366(30), 395(100)

* Выделенным шрифтом указаны времена удерживания примесей, обнаруженных в обоих экстрактах дротаверина.

соответственно. Их сопоставление показывает, что примеси, найденные при обычном анализе, обнаружены и при использовании предложенного нами нового подхода, но в последнем случае зарегистрировано еще 10 примесей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено исследование возможности обнаружения числа примесей в фармацевтических препаратах и субстанциях, основанного на извлечении методами жидкостной экстракции (ЖЭ) и сверхкритической флюидной экстракции с последующим анализом части либо всего концентрата методами ГХ/МС (ЭИ), ГХ/МС (ФХИАД) и реакционной ГХ/МС (ЭИ). Проведено сопоставление числа летучих и среднелетучих примесей, обнаруженных в оригинальных фармпрепаратах и соответствующих дженериках. Показана возможность сравнения этих препаратов на основании сопоставления многомерных профилей зарегистрированных примесей (времена удерживания, спектры ЭИ, спектры ФХИАД, молекулярные массы, число летучих и термостабильных примесей и число производных, полученных после дериватизации примесей (целенаправленной химической реакции, продуктами которой являются термостабильные и летучие вещества).

Такой подход позволяет наиболее достоверно установить аутентичность исследуемых препаратов и оценить качество продукции различных производителей (оригиналов и дженериков).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Глазков И.Н., Ревельский И.А., Кузякин С.В., Кузнецов М.П., Богданов А.А., Мартынов А.А., Ефимов И.П., Золотов Ю.А. СКФ-ТП. 2006. Т. 1. № 1. С. 52.
- Ревельский А.И., Ревельский И.А. В сб.: Хроматография на благо России. М.: Изд. группа «Граница». 2007. С. 249.

3. Авторское свидетельство № 1159412 «Способ масс-спектрометрического анализа газовой смеси». Авторы: И.А. Ревельский, Ю.С. Яшин, В.Н. Вознесенский, В.К. Курочкин, Р.Г. Костяновский.

**A NEW APPROACH TO THE COMPARISON OF ORIGINAL
PHARMACEUTICALS AND GENERICS, BASED ON COMPARISON
OF MULTIDIMENSIONAL IMPURITY PROFILES USING
SUPERCritical FLUID EXTRACTION, LIQUID EXTRACTION
AND GC-MS**

**A.I. Revelsky, I.N. Glazkov, Yu.S. Yashin, D.A. Chepelyansky,
A.S. Samokhin, D.A. Burmykin, I.A. Revelsky**

Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow, Russia

The possibility of comparison of original pharmaceuticals and their generics, based on multidimensional profiles of impurities isolated from different samples by supercritical fluid extraction and liquid extraction and registered by gas-chromatography/mass-spectrometry with electron ionization (EI) and atmospheric pressure photochemical ionization (APCI) is investigated. The utilization of the suggested approach allows one to increase of the number of registered impurities and, thus, to identify the authenticity of pharmaceutical samples and to compare the quality of original pharmaceuticals and their generics.

Key words: impurities in pharmaceuticals, generics, GC-MS, derivatization, supercritical fluid extraction, liquid extraction, atmospheric pressure photochemical ionization mass-spectrometry.
