

Рентгенофазовый анализ кристаллических форм линезолида при контроле качества фармацевтической субстанции

В. С. Кузьмин^{1,*}, В. В. Чернышев², А. И. Лутцева¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

² Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Ленинские Горы, д. 1, стр. 3, Москва, 119991, Российская Федерация

Резюме. Работа является продолжением исследований по применению метода рентгенофазового анализа (РФА) для подтверждения подлинности лекарственных средств, обладающих полиморфизмом. **Цель работы:** сравнительный анализ образцов субстанции линезолида разных производителей методом РФА. **Материалы и методы:** измерения проводили на порошковом дифрактометре Empyrean (PANalytical, Нидерланды) с линейным твердофазным детектором X'Celerator с использованием CuK_α -излучения и никелевого фильтра. Результаты регистрировали при длинах волн излучения 1,5406 и 1,5444 Å с соотношением интенсивностей в дублете 2:1. Для количественной оценки использовали двухфазное уточнение полученных дифрактограмм методом Ритвельда. **Результаты:** проведено сравнение дифрактограмм трех промышленных образцов линезолида. Выявленные различия проанализированы на основании имеющихся в литературе данных о полиморфных модификациях линезолида. Установлено, что только формы II и IV следует считать различными полиморфными модификациями линезолида. **Выводы:** установлено, что образцы субстанции линезолида разных производителей могут представлять собой различные полиморфные модификации или их смеси. Для оценки качества фармацевтической субстанции линезолида методом рентгенофазового анализа необходимо сравнение полученных результатов с дифрактограммой стандартного образца формы IV и включение данного требования в нормативную документацию на лекарственное средство.

Ключевые слова: экспертиза качества; полиморфизм; линезолид; рентгенофазовый анализ; конформеры

Для цитирования: Кузьмин ВС, Чернышев ВВ, Лутцева АИ. Рентгенофазовый анализ кристаллических форм линезолида при контроле качества фармацевтической субстанции. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2019;9(4):261–264. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-4-261-264>

***Контактное лицо:** Кузьмин Владимир Семенович; KuzminVS@expmед.ru

X-ray Diffraction Analysis of Linezolid Crystalline Forms as Part of Quality Control of the Active Ingredient

V. S. Kuzmin^{1,*}, V. V. Chernyshev², A. I. Luttseva¹

¹ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

² M. V. Lomonosov Moscow State University,
1/3 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russian Federation

Abstract. This work is a continuation of research on the use of X-ray diffraction analysis (XRD) for identification of medicines that exhibit polymorphism. **The aim** of the paper was to perform comparative XRD analysis of linezolid samples produced by different manufacturers. **Materials and methods:** the measurements were performed using an Empyrean X-ray powder diffraction system (PANalytical, Netherlands) with an X'Celerator linear solid-state detector using Ni-filtered CuK_α radiation. The results were recorded at 1.5406 and 1.5444 Å with the intensity ratio in the doublet of 2:1. The two-phase Rietveld refinement of the obtained diffractograms was used for the quantitative analysis. **Results:** the authors compared diffractograms of three commercial samples of linezolid. The revealed differences were analysed taking into consideration available literature on the polymorphic forms of linezolid. It was demonstrated that only forms II and IV should be considered as different polymorphs of linezolid. **Conclusions:** the study demonstrated that linezolid samples produced by different manufacturers could represent different polymorphs or mixtures thereof. The evaluation of linezolid quality by X-ray diffraction analysis requires the comparison of the obtained results with the diffractogram of the form IV reference standard. Relevant information should be provided by manufacturers in the product specification file.

Key words: quality control; polymorphism; linezolid; X-ray diffraction analysis; conformers

For citation: Kuzmin VS, Chernyshev VV, Luttseva AI. X-ray diffraction analysis of linezolid crystalline forms as part of quality control of the active ingredient. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2019;9(4):261–264. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-4-261-264>

***Corresponding author:** Vladimir S. Kuzmin; KuzminVS@expmед.ru

Значимость и необходимость использования метода рентгеновской порошковой дифрактометрии (метода рентгенофазового анализа, РФА) при проведении оценки качества лекарственных средств по показателю «Подлинность» описана авторами в работе «Рентгеновская порошковая дифрактометрия: контроль качества лекарственных средств» [1]. Применение метода РФА особенно актуально для лекарственных средств, существующих в различных полиморфных модификациях. При подтверждении подлинности фармацевтических субстанций, обладающих полиморфизмом, данный метод имеет преимущество перед другими инструментальными методами идентификации органических соединений (ЯМР-, ИК-, УФ-спектроскопии и хроматомасс-спектрометрии).

Линезолид, который может существовать в различных полиморфных формах, является одним из основных представителей класса оксазолидинонов, проявляющих активность против грамположительных микроорганизмов [2].

Цель работы — сравнительный анализ образцов субстанции линезолида разных производителей методом РФА.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы субстанции линезолида были получены от трех производителей: Glenmark Life Sciences Ltd, India (образец 1); ООО «БратскХимСинтез», Россия (образец 2) и Pfizer Asia Pacific Pte Ltd, Singapore (образец 3).

Рентгеновские дифракционные измерения порошковых образцов проводили на дифрактометре Empyrean (PANalytical, Netherlands) с линейным твердофазным детектором X'Celerator с использованием CuK_α -излучения и никелевого фильтра. Результаты регистрировали, учитывая длины волн — 1,5406 и 1,5444 Å с соотношением интенсивностей в дублете 2:1. Напряжение и ток на рентгеновской трубке составляли 45 кВ и 35 мА соответственно. Образцы осторожно растирали в агатовой ступке и помещали в кремниевую кювету, обеспечивающую минимальный фон. Измерения проводили в геометрии Брэгга—Брентано (на отражение) в области углов 5° – 50° 2θ , тип сканирования — непрерывный, скорость сканирования 0,3 град./мин с шагом 0,017°.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для субстанции линезолида описаны и задокументированы следующие полиморфные формы — I [3], II [4], III [5] и IV [6]. Кроме того, D. Joshipura и A. Kulshrestha утверждают, что перекристаллизацией субстанции линезолида при комнатной температуре из метанола, пропанола и этанола им удалось получить три новые полиморфные формы, которые они обозначили A1, B1 и C1 соответственно и которые отличаются от четырех предыдущих [7]. Однако

эти результаты пока не получили независимого подтверждения, и в дальнейшем мы будем рассматривать только формы I–IV.

На рисунке 1 показаны рентгеновские дифрактограммы трех исследованных образцов субстанции линезолида. Заметны различия в дифрактограммах как по положениям пиков, так и по соотношениям их высот. В рентгенофазовом анализе для идентификации конкретной кристаллической фазы принципиальным является набор положений пиков, так как при совпадении положений пиков различие в соотношении их высот может быть обусловлено наличием текстуры в образце. Перед тем как приступить к РФА исследованных образцов, мы подвергнем тщательному анализу литературные данные о формах I–IV линезолида.

Детальное и полное изучение кристаллических модификаций линезолида методами рентгеноструктурного анализа, РФА, дифференциально-сканирующей калориметрии (ДСК), а также ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР проведено в работе [8]. Авторы установили кристаллические структуры полиморфных форм II и IV и, основываясь на результатах комплексного исследования форм II и IV, убедительно доказали, что энергетический барьер перехода формы II в IV невысок и происходит при нагревании до 120°C . Обратный переход из формы IV в II легко происходит при повышенной влажности, суспендировании или измельчении. Выявлены различия в конформациях независимых молекул в кристаллических фазах II и IV, что согласуется с невысоким значением энергетического барьера фазового перехода. Также авторы отметили, что форма III не является новой полиморфной модификацией, а представляет собой смесь форм II и IV [8]. Форма I линезолида не была

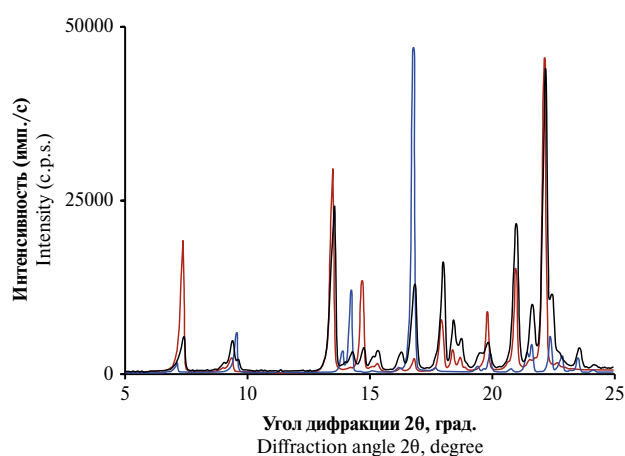


Рис. 1. Сравнение дифрактограмм образцов линезолида в области углов 5° – 25° 2θ (кривая красного цвета — образец 1, кривая синего цвета — образец 2, кривая черного цвета — образец 3)

Fig. 1. The comparison of linezolid diffractograms in the angular range of 5° – 25° 2θ (red curve — sample 1, blue curve — sample 2, black curve — sample 3)

Таблица 1. Положения (2θ) и относительные интенсивности основных дифракционных пиков форм II и IV линезолида
Table 1. The positions (2θ) and relative intensities of the main diffraction peaks of linezolid forms II and IV

Форма II Form II		Форма IV Form IV	
2θ, град. 2θ, degree	Относительная интенсивность, % Relative intensity, %	2θ, град. 2θ, degree	Относительная интенсивность, % Relative intensity, %
7,12	3	7,35	42
9,57	12	8,98	1
13,91	5	9,35	5
14,27	23	13,51	70
16,83	100	14,74	33
19,46	2	15,36	3
19,98	6	16,82	3
21,47	5	17,99	18
21,66	8	18,44	6
22,44	12	19,86	15
22,89	5	21,03	35
23,57	4	22,18	100

подробно изучена в работе [8], однако сравнение дифрактограммы формы I, впервые полученной в [3], а также дифрактограммы формы I, приведенной в [9], с дифрактограммой формы IV [8] показывает их полное соответствие, т.е. формы I и IV представляют собой одну и ту же полиморфную модификацию. Далее мы будем использовать нумерацию форм, которую использовали авторы в работе [8].

Мы делаем заключение, что только формы II и IV являются различными полиморфными модификациями линезолида. Термостабильной является форма IV, поэтому Управление по контролю за каче-

ством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) с 2000 г. рекомендует использовать именно эту форму при производстве различных лекарственных средств, содержащих линезолид [10].

Наборы полученных в нашей работе основных характерных дифракционных пиков, с помощью которых можно различить формы II и IV линезолида, приведены в таблице 1.

При сравнении положений основных пиков на дифрактограммах образцов 1 и 2 с положениями пиков, указанных в таблице, установлено, что образец 1 соответствует форме IV, а образец 2 — форме II. Более того, имеющиеся сведения о кристаллических структурах форм II (ромбическая сингония) и IV (триклинная сингония) позволили провести уточнение методом Ритвельда по всей дифрактограмме с помощью программы MRIA [11]. Проведенное уточнение показало, что каждая из дифрактограмм полностью соответствует только одной кристаллической фазе, т.е. образцы 1 и 2 являются однофазными, хотя и содержат разные полиморфные модификации.

На дифрактограмме образца 3 присутствуют в основном пики, характерные для формы IV линезолида, и вместе с тем некоторые пики, соответствующие форме II. Двухфазное уточнение методом Ритвельда дифрактограммы образца 3 (рис. 2) позволило провести количественную оценку соотношения форм IV и II в образце 3, которое составило 9:1.

Следует отметить, что наличие в коммерческом образце субстанции линезолида (форма IV) примеси формы II описано авторами работы [10]. Исследуя методом РФА полиморфные модификации II и IV линезолида, М. Sun с соавт. установили, что в субстанции формы IV, которая используется

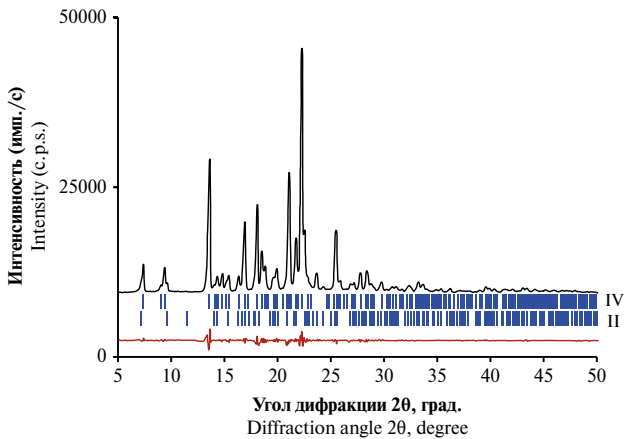


Рис. 2. Результат двухфазного уточнения дифрактограммы образца 3 методом Ритвельда по программе MRIA (черным цветом — экспериментальная кривая, красным цветом — разностная кривая, вертикальные отрезки синего цвета — рассчитанные положения пиков линезолида, верхний ряд — форма IV, нижний ряд — форма II)

Fig. 2. The results of two-phase Rietveld refinement of the sample 3 diffractogram using the MRIA programme (black line — fitted curve, red line — difference curve, vertical blue lines — calculated positions of linezolid peaks, upper row — form IV, lower row — form II)

для производства таблеток линезолида, присутствует около 1 % (по массе) формы II. Авторы также утверждают, что присутствие в фармакопейной субстанции линезолида примеси формы II даже в небольшом количестве способствует конформационной конверсии субстанции из формы IV в форму II [10].

В литературе не найдены данные о различиях в биодоступности полиморфных модификаций линезолида. Более того, нет однозначной информации о биодоступности линезолида безотносительно к полиморфным модификациям. Например, по данным опубликованных отчетов Всемирной организации здравоохранения¹ линезолид отнесен к классу I по биофармацевтической классификационной системе (БКС). Соединения этого класса характеризуются хорошей растворимостью в биологических жидкостях и хорошей проницаемостью через биомембраны. В то же время А.М. Kadam и S.S. Patil относят линезолид к классу IV системы БКС (низкая растворимость, низкая проницаемость) [12]. Можно предположить, что отнесение линезолида к различным классам БКС связано с тем, что в исследованиях по растворимости и биопроницаемости использовали субстанции разных полиморфных модификаций.

Производители линезолида используют метод РФА при определении подлинности субстанции для подтверждения, что в образце присутствует только одна полиморфная модификация, однако в нормативной документации отсутствует четкое

указание на необходимость использования стандартного образца формы IV линезолида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты собственных исследований фармацевтической субстанции линезолида показали, что образцы субстанции разных производителей могут представлять собой различные полиморфные модификации линезолида или их смеси.

Следовательно, при использовании метода рентгеновской порошковой дифрактометрии для оценки качества фармацевтической субстанции линезолида необходимо ввести дополнительное требование — сравнивать результаты анализа с дифрактограммой стандартного образца формы IV и представлять соответствующую информацию в нормативной документации на лекарственное средство.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР AAAA-A18-118021590049-0).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00154-19-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. AAAA-A18-118021590049-0).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Кузьмин ВС, Чернышев ВВ, Лутцева АИ. Рентгеновская порошковая дифрактометрия: контроль качества лекарственных средств. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2018;(3):158–61. [Kuzmin VS, Chernyshev VV, Luttseva AI. X-ray powder diffraction in quality control of medicines. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2018;(3):158–61 (In Russ.).] <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-3-158-161>
2. Ефременкова ОВ, Белоусов ЮБ. Линезолид — первый препарат нового класса антибактериальных средств оксазолидинонов. *Качественная клиническая практика*. 2002;(2):2–11. [Efremenkova OV, Belousov YuB. Linezolid — the first drug of a new class of antibacterial agents oxazolidinones. *Kachestvennaya klinicheskaya praktika* = *Good Clinical Practice*. 2002;(2):2–11 (In Russ.)]
3. Brickner SJ, Hutchinson DK, Barbachyn MR, Manninen PR, Ulanowicz DA, Garmon SA, et al. Synthesis and antibacterial activity of U-100592 and U-100766, two oxazolidinone antibacterial agents for the potential treatment of multidrug-resistant gram-positive bacterial infections. *J Med Chem*. 1996;39(3):673–9. <https://doi.org/10.1021/jm9509556>
4. Bergren MS. Linezolid — crystal form II. Patent No. US6559305B1; 2003.
5. Mohan Rao D, Krishna Reddy P. A novel crystalline form of linezolid. Patent No. WO/2005/035530; 2005.
6. Aronhime J, Koltai T, Braude V, Fine S, Niddam T. Crystalline form IV of linezolid. Patent No. WO/2006/004922; 2006.
7. Jshipura D, Kulshrestha A. Crystal forms of linezolid. *Der Pharmacia Lettre*. 2013;5(1):279–84.
8. Maccaroni E, Alberti E, Malpezzi L, Masciocchi N, Vladiskovic C. Polymorphism of linezolid: a combined single-crystal, powder diffraction and NMR study. *Int J Pharm*. 2008;351(1–2):144–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.09.028>
9. Karagiannidou EG. Solid state characterization of linezolid crystal forms. *International Journal of Analytical, Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 2013;2(2). https://www.researchgate.net/publication/256684948_Solid_State_Characterization_of_Linezolid_Crystal_forms
10. Sun M, Hu X, Zhou X, Gu J. Determination of minor quantities of linezolid polymorphs in a drug substance and tablet formulation by powder X-ray diffraction technique. *Powder Diffraction*. 2017;32(2):78–85. <https://doi.org/10.1017/S0885715617000069>
11. Zlokazov VB, Chernyshev VV. MRSA — a program for a full profile analysis of powder multiphase neutron-diffraction time-of-flight (direct and Fourier) spectra. *J Appl Cryst*. 1992;25:447–51.
12. Kadam AM, Patil SS. Improvement of micromeritic, compressibility and solubility characteristics of linezolid by crystallo-co-agglomeration technique. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2017;9(4):47–53. <https://doi.org/10.22159/ijap.2017v9i4.18915>

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Кузьмин Владимир Семенович, д-р хим. наук. Vladimir S. Kuzmin, Dr. Sci. (Chem.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-2533-8142>

Чернышев Владимир Васильевич, д-р физ.-мат. наук. Vladimir V. Chernyshev, Dr. Sci. (Phys.-Math.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-8514-7471>

Лутцева Анна Ивановна, канд. фарм. наук. Anna I. Luttseva, Cand. Sci. (Pharm.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-8752-5245>

Статья поступила 19.06.2019

После доработки 06.09.2019

Принята к печати 19.11.2019

Article was received 19 June 2019

Revised 6 September 2019

Accepted for publication 19 November 2019

¹ <https://extranet.who.int/prequal/sites/default/files/TB299part6v1.pdf>