

УДК 577.29:615

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РОДСТВЕННЫХ ПРИМЕСЕЙ
В СУБСТАНЦИИ НОВОГО СОЕДИНЕНИЯ
С АНТИАРИТМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ АЛМ-802**

*Л.Н. Грушевская, В.В. Аджиенко, М.С. Сергеева, Л.М. Гаевая, М.Е. Дуденкова,
Е.Д. Денисенко, Н.И. Авдюнина, С.В. Минаев, Г.В. Мокров*

*ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»,
опытно-технологический отдел*

Разработана методика определения родственных примесей в субстанции нового соединения с антиаритмической активностью – АЛМ-802. Разделение АЛМ-802 и примесей проведено методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на колонке BDS Hypersil 150 x 4,6 мм, 5 мкм (Thermo Scientific) в градиентном режиме элюирования. В качестве подвижной фазы использованы смеси 0,02 М раствора калия дигидрофосфата, метанола и ацетонитрила. Детектор спектрофотометрический, аналитическая длина волны 205 нм. В экспериментальном образце субстанции АЛМ-802 обнаружен ряд неидентифицированных примесей, продукта синтеза, 2,3,4-триметоксибензальдегида, обнаружено не было.

Ключевые слова: АЛМ-802, родственные примеси, высокоэффективная жидкостная хроматография.

DOI 10.19163/1994-9480-2019-4(72)-77-80

**DEVELOPMENT OF THE TECHNIQUE FOR DETERMINATION OF IMPURITIES
IN SUBSTANCE OF THE NEW COMPOUND
WITH AN ANTIARRHYTHMIC ACTIVITY – ALM-802**

*L.N. Grushevskaja, V.V. Adzhienko, M.S. Sergeeva, L.M. Gaevaja, M.E. Dudenkova,
E.D. Denisenko, N.I. Avdjunina, S.V. Minaev, G.V. Mokrov*

*FSBSI «Research Institute of Pharmacology named after V.V. Zakusov»,
experimental-technological department*

A technique for determining related impurities in the substance of a new compound with antiarrhythmic activity – ALM-802 has been developed. Separation of ALM-802 and impurities was carried out by reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC) on a BDS Hypersil 150 x 4.6 mm, 5 μm column (Thermo Scientific) in gradient elution mode. Mixtures of a 0,02 M potassium dihydrogen phosphate solution, methanol and acetonitrile were used as the mobile phase. Spectrophotometric detector, analytical wavelength 205 nm. A number of unidentified impurities were found in the experimental sample of ALM-802, the synthesis product, 2,3,4-trimethoxybenzaldehyde, was not found.

Key words: ALM-802, related impurities, high-performance liquid chromatography.

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» в результате исследований, направленных на поиск и создание новых лекарственных средств с антиаритмической активностью, было получено новое соединение АЛМ-802, представляющее собой тригидрохлорид N¹-(2,3,4-триметоксибензил)-N²-{2-[(2,3,4-триметоксибензил)амино]этил}-1,2-этандиамина (рис. 1).

В исследованиях на лабораторных животных (крысах) новое соединение проявило выраженную антиаритмическую и антиишемическую активность, что свидетельствовало о перспективности дальнейшей разработки лекарственного средства на его основе [1, 2, 5].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Разработка методики определения родственных примесей в субстанции АЛМ-802, проведенной в рамках фармацевтической разработки нового лекарственного препарата.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на экспериментальном образце субстанции АЛМ-802, синтезированной в отделе химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

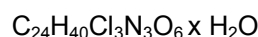
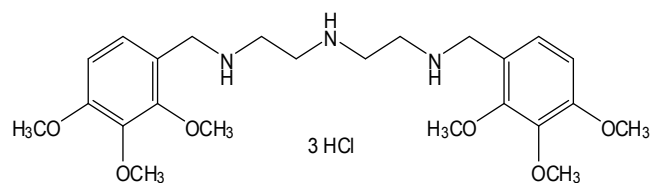


Рис. 1. Тригидрохлорид N¹-(2,3,4-триметоксибензил)-N²-{2-[(2,3,4-триметоксибензил)амино]этил}-1,2-этандиамина (АЛМ-802)

В нашем распоряжении также имелся образец исходного продукта синтеза АЛМ-802 – 2,3,4-триметоксибензальдегид (Sigma-Adrich, 152099).

Разработка проведена методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе Beckman System Gold со спектрофотометрическим детектором. Ячейка детектора стандартная, с длиной оптического пути 10 мм, объем петли дозатора 20 мкл.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

УФ-спектр АЛМ-802 в воде очищенной в диапазоне длин волн от 200 до 350 нм имеет три максимума поглощения: (269 ± 2) ; (267 ± 2) и (205 ± 2) нм, наиболее выраженным из которых является максимум при 205 нм. УФ-спектр 2,3,4-триметоксибензальдегида в том же диапазоне длин волн имеет максимумы при (284 ± 2) ; (232 ± 2) и (209 ± 2) нм.

Поскольку продукты деградации АЛМ-802 с высокой вероятностью также будут поглощать электромагнитное излучение в области 200–220 нм, длина волны 205 нм была выбрана нами в качестве аналитической.

Хроматографическое разделение было решено проводить на сорбенте С18, в качестве подвижных фаз были использованы смеси ацетонитрила, метанола и растворов калия гидрофосфата и калия дигидрофосфата в воде.

Оптимальных результатов удалось добиться с применением колонки BDS Hypersil 150x4,6 мм, 5 мкм (Thermo Scientific) в градиентном режиме хроматографирования.

Подвижная фаза А (ПФ А) представляла собой смесь 0,02М раствора калия дигидрофосфата (рН 2,8, доведен до нужного значения фосфорной кислотой концентрированной), ацетонитрила и метанола в соотношении 200:25:25 соответственно, по объему. Подвижная фаза Б (ПФ Б) состояла из 0,02М с рН 2,8, ацетонитрила и метанола в объемном соотношении 100:50:50 соответственно. Скорость потока подвижной фазы составляла 1 мл/мин. Профиль градиента представлен в табл. 1.

Таблица 1

Профиль градиентного элюирования при определении родственных примесей в субстанции АЛМ-802

Время, мин	ПФ А, %	ПФ Б, %
0–1	100	0
1–20	От 100 до 25	От 0 до 85
20–21	25	85
21–26	От 25 до 100	От 85 до 0
26–30	100	0

В указанных условиях время удерживания АЛМ-802 составляло около 8 мин, а время удерживания 2,3,4-триметоксибензальдегида – около 16 мин (относительное время удерживания 1,96).

Линейная зависимость площади пика от концентрации растворов АЛМ-802 и 2,3,4-триметокси-

бензальдегида была подтверждена в диапазоне концентраций от 0,001 до 0,1 мг/мл (рис. 2).

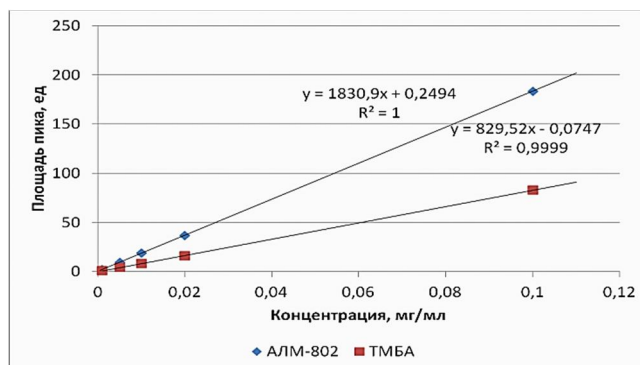


Рис. 2. Зависимость площади пика от концентрации растворов АЛМ-802 и 2,3,4-триметоксибензальдегида (ТМБА)

Пределы обнаружения и количественного определения были определены экспериментально, исходя из соотношения сигнал/шум, и составили для АЛМ-802 – 0,003 мкг и 0,01 мкг соответственно и для 2,3,4-триметоксибензальдегида – 0,006 мкг и 0,02 мкг соответственно.

Из полученных данных видно, что при концентрации испытуемого раствора субстанции АЛМ-802 1 мг/мл примесь 2,3,4-триметоксибензальдегида можно будет обнаружить в содержании 0,05 % и даже несколько менее.

Хроматограмма испытуемого раствора субстанции АЛМ-802 (концентрация 1 мг/мл) представлена на рис. 3.

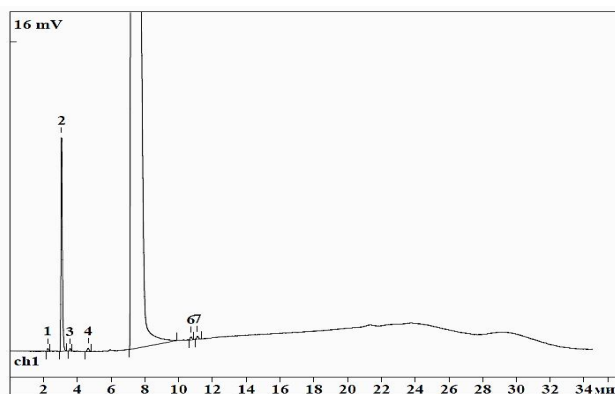


Рис. 3. Хроматограмма раствора АЛМ-802 (1 мг/мл)

Примеси 2,3,4-триметоксибензальдегида в испытуемом растворе обнаружено не было, однако в нем присутствовали неидентифицированные примеси.

Нами были предприняты попытки оптимизации хроматографических условий с целью уменьшения времени анализа, однако сокращение времени градиента приводило к ухудшению разрешения неидентифицированных примесей между собой, а все опробованные изменения состава подвижных

фаз приводили к ухудшению разрешения пиков неидентифицированных примесей как между собой, так и с пиком АЛМ-802.

В результате проведенных исследований было решено использовать для определения примесей в субстанции АЛМ-802 указанные выше хроматографические условия.

В рамках валидации разработанной методики мы провели оценку правильности и прецизионности определения примеси 2,3,4-триметоксибензальдегида в разработанных условиях на модельных смесях с субстанцией АЛМ-802 в содержании 0,05; 0,1 и 0,2 % от концентрации испытуемого раствора АЛМ-802.

Для приготовления испытуемых растворов предварительно готовили растворы 2,3,4-триметоксибензальдегида в подвижной фазе А с концентрациями 0,005; 0,01 и 0,02 мг/мл. Затем в три мерные колбы вместимостью 10 мл помещали 10 мг субстанции АЛМ-802, приливали по 1 мл полученных растворов 2,3,4-триметоксибензальдегида, прибавляли 5 мл подвижной фазы А, встряхивали содержимое колбы до растворения и доводили объем раствора в колбе до метки подвижной фазой А.

Для расчета содержания 2,3,4-триметоксибензальдегида в испытуемых растворах готовили раствор для определения поправочного коэффициента с концентрациями АЛМ-802 и 2,3,4-триметоксибензальдегида 0,01 мг/мл. Рассчитанный коэффициент составлял 2,25.

Результаты изучения правильности и прецизионности методики представлены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты определение содержания примеси 2,3,4-триметоксибензальдегида в модельных смесях

Содержание в % от концентрации исп. раствора	Взято*, мг (m_1)	Найдено, мг (m_2)	Абсолютная ошибка (А), ($m_2 - m_1$)	Относительная ошибка (δ), $A \times 100/m_1$	Найдено, %	Метрологические характеристики
0,5	0,0515	0,0509	-0,0006	1,17	98,83	$X_{cp} = 99,93$ $S = 2,85$ $RSD = 2,85 \%$ $\Delta X = 2,24$ $\epsilon = 2,24 \%$ $t_{выч.} = 0,07$ $t_{табл.} = 2,36$
0,5	0,0495	0,0507	+0,0012	2,42	102,42	
0,5	0,0505	0,0509	+0,0004	0,79	100,79	
0,2	0,0206	0,0201	-0,0005	2,43	97,57	
0,2	0,0198	0,0196	-0,0002	1,01	98,99	
0,2	0,0202	0,0208	+0,0006	2,97	102,97	
0,1	0,0103	0,0107	+0,0004	3,88	103,88	
0,1	0,0099	0,0094	-0,0005	5,05	94,95	
0,1	0,0101	0,0100	-0,0001	0,99	99,01	

Таким образом, было показано, что доверительный интервал среднего значения включает 100 % и значения вычисленного коэффициента Стьюдента ($t_{выч.}$) не превышают табличные ($t_{табл.}$), а следовательно, полученные результаты не отягощены

систематической ошибкой. Разработанная методика правильна [3, 4]. Величина относительной ошибки единичного определения не превышает 6 %, а также значение коэффициента вариации RSD не превышает 5 %, что свидетельствует об удовлетворительной сходимости результатов.

Для оценки пригодности хроматографической системы было предложено готовить два раствора: раствор для проверки чувствительности методики (раствор АЛМ-802 с концентрацией 0,0005 мг/мл) и раствор для проверки разделительной способности системы (раствор АЛМ-802 и 2,3,4-триметоксибензальдегида с концентрациями каждого из соединений 0,01 мг/мл).

Высота пика АЛМ-802 на хроматограммах раствора для проверки чувствительности хроматографической системы должна превышать расчетную величину шума базовой линии (сигнал/шум) не менее чем в 3 раза.

Результаты хроматографирования раствора для проверки разделительной способности системы представлены в табл. 3.

Таблица 3

Результаты определения и критерии пригодности хроматографической системы

Результаты определения параметров пригодности хроматографической системы			
Число теоретических тарелок для пика АЛМ-802, N	Коэффициент асимметрии по пику АЛМ-802, As	RSD площадей пиков АЛМ-802	Rs пиков АЛМ-802 и 2,3,4-триметоксибензальдегида
24183 ± 442	1,85 ± 0,07	1,41 ± 0,08 %	38,5 ± 0,5
Критерии приемлемости			
Не менее 23000	Не более 2,0	Не более 2 %	Не менее 37,0

В результате проведенных испытаний были установлены следующие критерии пригодности хроматографической системы: число теоретических тарелок – не менее 23000; коэффициент асимметрии пика АЛМ-802 – не более 2; относительное стандартное отклонение результатов отдельных измерений площадей пика АЛМ-802 – не более 2 %, Rs пиков АЛМ-802 и 2,3,4-триметоксибензальдегида – не менее 37,0.

С помощью разработанной методики было определено содержание родственных примесей в экспериментальном образце субстанции АЛМ-802. Как уже было указано, примеси 2,3,4-триметоксибензальдегида в субстанции обнаружено не было, однако в ней присутствовали неидентифицированные примеси: примесь со временем удерживания около 3 мин ($t_{отн.}$ 0,43) в содержании 3,02 %, а также четыре других неидентифицированных примеси в содержании 0,04 % ($t_{отн.}$ 0,50), 0,07 % ($t_{отн.}$ 0,65), 0,06 % ($t_{отн.}$ 1,50) и 0,06 % ($t_{отн.}$ 1,55).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований нами была разработана методика определения содержания родственных примесей в субстанции АЛМ-802 с помощью ВЭЖХ.

Разработанная методика валидирована в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV издания и в дальнейшем может быть использована для определения содержания родственных примесей в фармацевтической субстанции АЛМ-802.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барчуков В.В., Цорин И.Б., Вититнова М.Б. и др. Изучение противоишемической активности представителя ряда α, ω -диарилметильных производных бис-(ω -аминоалкил)аминов – соединения АЛМ-802 на модели острой эндокардиальной ишемии миокарда у крыс с эндотелиальной дисфункцией // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – Т. 81 (1). – С. 23.
2. Мокров Г.В., Лихошерстов А.М., Барчуков В.В. и др. Исследование влияния положения метокси-группы на кардиотропную активность соединения АЛМ-802 // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2019. – № 1. – С. 6–11.
3. ОФС.1.1.0013.15. Статистическая обработка результатов химического эксперимента // Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. – 2018. – Т. 1. – С. 289–318.
4. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методов // Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. – 2018. – Т. 1. – С. 276–288.
5. Середенин С.Б., Мокров Г.В., Крыжановский С.А. и др. Бис(метоксибензиламиноалкил)амины, обладающие кардиотропной активностью. Патент РФ 2624438. – Бюл. изобрет. № 19. – 2017.

REFERENCES

1. Barchukov V.V., Corin I.B., Vititnova M.B. i dr. Izuchenie protivoišemicheskoj aktivnosti predstavitelja rjada α, ω -diarilmetil'nyh proizvodnyh bis-(ω -aminoalkil)aminov – soedinenija alm-802 na modeli ostroj jendokardial'noj ishемии miokarda u kryс s jendotelial'noj disfunkciej [Study of the anti-ischemic activity of a representative of a series of α, ω -diarylmethyl derivatives of bis (ω -aminoalkyl) amines - ALM-802 compounds in a model of acute endocardial myocardial ischemia in rats with endothelial dysfunction]. *Jeksperimental'naja i kliničeskaja farmakologija* [Experimental and Clinical Pharmacology], 2018, Vol. 81 (1), pp. 23. (In Russ.; abstr. in Engl.).
2. Mokrov G.V., Lihosherstov A.M., Barchukov V.V. i dr. Issledovanie vlijanija položenija metoksi-gruppy na kardiotropnuju aktivnost' soedinenija ALM-802 [Investigation of the influence of the position of the methoxy group on the cardiotropic activity of the ALM-802 compound]. *Farmakokinetika i farmakodinamika* [Pharmacokinetics and Pharmacodynamics], 2019, no. 1, pp. 6–11. (In Russ.; abstr. in Engl.).
3. OFS.1.1.0013.15. Statisticheskaja obrabotka rezul'tatov himičeskogo jeksperimenta [Statistical processing of the results of a chemical experiment]. In Gosudarstvennaja Farmakopeja Rossijskoj Federacii XIV izdanija [State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition]. 2018. Vol. 1. P. 289–318.
4. OFS.1.1.0012.15. Validacija analitičeskikh metodik [Validation of analytical methods]. In Gosudarstvennaja Farmakopeja Rossijskoj Federacii XIV izdanija [State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition]. 2018. Vol. 1. P. 276–288.
5. Seredenin S.B., Mokrov G.V., Kryzhanovskij S.A. i dr. Bis(metoksibenziламиноалкил)амины, обладающие кардиотропной активностью. Патент РФ 2624438. Бюл. изобрет. № 19. 2017.

Контактная информация

Гаевая Людмила Михайловна – д. фарм. н., ведущий научный сотрудник химико-технологической лаборатории опытно-технологического отдела ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», e-mail: otopharm@mail.ru