

**Цечёв Артур Тимурович**

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ДЛЯ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА И ИЗУЧЕНИЯ  
ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО  
СОЕДИНЕНИЯ ИЗ ГРУППЫ ЗАМЕЩЕННЫХ  
2-АМИНОПИРРОЛОВ, ОБЛАДАЮЩЕГО ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ  
АКТИВНОСТЬЮ**

**3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия**

**АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук**

**Самара 2024**

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

Кандидат фармацевтических наук, доцент Карпенко Юлия Николаевна

**Официальные оппоненты:**

**Стрелова Ольга Юрьевна** – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой фармацевтической химии.

**Кобелева Татьяна Алексеевна** – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой химии и фармакогнозии.

**Ведущая организация:** федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Уфа.

Защита диссертации состоится «\_\_»\_\_\_\_\_202\_ г. в 1\_.00 часов на заседании диссертационного совета 21.2.061.06 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171) и на сайте (<http://www.samsmu.ru/scientists/science/referats/2024>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 202\_ г.

**Ученый секретарь диссертационного совета,**  
кандидат фармацевтических наук, доцент

**Жданова Алина Валитовна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Обеспечение населения современными, эффективными и безопасными лекарственными средствами – один из главных приоритетов государственной политики Российской Федерации [Балакин, К. В. и др., 2021]. Залогом доступности качественной лекарственной помощи для потребителей является разработка отечественных инновационных препаратов, в том числе и для лечения онкологических заболеваний.

В Пермской государственной фармацевтической академии проводятся исследования, направленные на получение, изучение свойств и биологической активности производных 2-аминопиррола [Игидов Н.М. и др., 2016]. Ряд синтезированных соединений продемонстрировали цитотоксический эффект в отношении широкого спектра опухолевых клеток человека, индуцируя их гибель по механизму апоптоза [Voichuk S. et al., 2016; Зыкова С.С. и др., 2018].

Одно из наиболее активных соединений – 2-амино-1-(4-бромфенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-4,5-дигидро-1*H*-пиррол-3-карбоксамид (2-АБФПК) – стало кандидатом для углубленного изучения.

В связи с этим актуальным является изучение физико-химических свойств указанного соединения с целью разработки аналитических методик для оценки его качества, а также для определения в биологических средах при исследованиях фармакокинетики.

Результаты данных исследований позволят стандартизовать впервые полученную субстанцию биологически активного соединения и надлежащим образом провести дальнейшие испытания эффективности и безопасности потенциального лекарственного средства.

**Степень разработанности темы.** На кафедре общей и органической химии Пермской государственной фармацевтической академии профессором Игидовым Н.М. разработана методика получения производных 2-аминопирролкарбоновых кислот (2-АПКК) на основе рециклизации функционализированных фуран-2-онов воздействием СН-нуклеофилов в присутствии основания-катализатора [Игидов Н.М. и др., 2013]. В исследованиях биологической активности производных 2-АПКК [Voichuk S. et al., 2021] установлена их способность вызывать нарушения регуляции клеточного цикла и способствовать накоплению опухолевых клеток в М-фазе, а также индуцировать разрывы ДНК. Производные 2-АПКК являются новым классом соединений, исследований в области фармацевтического анализа до настоящего времени не проводилось.

**Цель работы** – разработка аналитических методик для стандартизации субстанции нового биологически активного соединения 2-АБФПК и изучения его фармакокинетики.

### **Задачи исследования:**

- изучить физико-химические свойства 2-АБФПК и определить фармакопейные показатели качества субстанции: описание, растворимость, температура плавления, потеря в массе при высушивании, вода, сульфатная зола, содержание тяжелых металлов, микробиологическая чистота;
- исследовать спектральные характеристики соединения 2-АБФПК и оценить возможность использования полученных данных для стандартизации субстанции;
- изучить хроматографическое поведение соединения в режиме обращенно-фазной ВЭЖХ;
- определить значения констант ионизации и коэффициента липофильности 2-АБФПК;
- разработать и валидировать методики контроля качества субстанции 2-АБФПК по показателям «Подлинность» и «Количественное определение» с помощью химических и физико-химических методов, провести их валидацию;

- разработать методику определения «родственных» примесей в субстанции 2-АБФПК методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, провести её валидационную оценку;
- разработать и валидировать методики контроля качества субстанции 2-АБФПК по показателю «Остаточные органические растворители» методом газожидкостной хроматографии;
- провести исследование лабораторных образцов субстанции 2-АБФПК и установить научно-обоснованные показатели и нормы качества;
- разработать и провести валидационную оценку методик количественного определения 2-АБФПК в биологических жидкостях лабораторных животных методом ВЭЖХ.

**Научная новизна.** В рамках исследований по стандартизации определены основные физические константы субстанции 2-АБФПК, изучены спектральные свойства соединения методами УФ-, ИК- спектрофотометрии и спектроскопии ядерного магнитного резонанса ( $^1\text{H}$ -ЯМР). Установлены константа ионизации и коэффициент липофильности 2-АБФПК.

Разработаны методики установления подлинности и количественного определения 2-АБФПК в субстанции на основе химических и физико-химических методов анализа.

Выбраны оптимальные хроматографические условия для разделения идентифицированных и неидентифицированных родственных примесей, а также остаточных органических растворителей в субстанции исследуемого соединения.

С помощью метода тандемной жидкостной хроматомасс-спектрометрии изучены процессы ионизации и фрагментации 2-АБФПК и его неидентифицированных примесей.

Предложены условия пробоподготовки и анализа 2-АБФПК в биологических жидкостях (плазме крови и моче) методом ВЭЖХ-УФ.

**Теоретическая и практическая значимость.** Результаты изучения физико-химических свойств, хроматографических характеристик соединения 2-АБФПК могут служить теоретической основой для разработки методик анализа других производных 2-АПБК.

На основании проведенных исследований разработаны и валидированы методики для контроля качества субстанции 2-АБФПК, установлены показатели и нормы качества, оформлен проект нормативной документации.

Высокая чувствительность и специфичность разработанных биоаналитических методик позволяют использовать их для изучения фармакокинетики 2-АБФПК на этапе доклинических исследований.

Методики оценки качества субстанции 2-АБФПК по показателям «Подлинность», «Родственные примеси», «Остаточные органические растворители», «Количественное определение» с положительной оценкой апробированы в химико-аналитической лаборатории АО «Медисорб», г. Пермь (Акт апробации от 19.02.2024 г).

Методика количественного определения биологически активного соединения 2-АБФПК в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием апробирована в лаборатории физико-химических методов анализа контрактной исследовательской организации «Парма Клиникал», г. Пермь (Акт апробации от 16.03.2024 г).

Результаты работы внедрены в учебный процесс кафедры токсикологической химии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России и используются при проведении практического занятия «Высокоэффективная жидкостная хроматография в анализе лекарственных средств, доклинических фармакокинетических исследованиях новых биологически активных соединений, синтезированных в Пермской фармацевтической академии, и определении биоэквивалентности» цикла «Стандартизация, подтверждение соответствия и контроль качества лекарственных средств» для преподавателей кафедр фармацевтических вузов и

училищ химического, технологического профиля, фармакогнозии и ботаники, проводимого на базе Регионального испытательного центра «Фарматест» и кафедры токсикологической химии ПГФА (Акт внедрения научных достижений в учебный процесс от 15.01.2024 г.).

Стандартизованные в соответствии с требованиями проекта НД серии субстанции 2-АБФПК переданы на кафедры токсикологической химии и фармакологии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России для проведения фармакокинетических исследований соединения, активная фармацевтическая субстанция 2-АБФПК включена в перспективный план работы ПГФА по внедрению новых лекарственных средств в медицинскую практику в качестве противоопухолевого средства (Акт внедрения результатов диссертационной работы в научную деятельность академии от 10.04.2024 г.).

**Методология и методы исследования.** Методология исследования включала анализ литературных данных, оценку актуальности работы, постановку цели и задач, выполнение эксперимента по разработке и валидации аналитических и биоаналитических методик, статистическую оценку полученных результатов.

В работе был использован комплекс современных химических и физико-химических методов анализа: спектроскопия ядерного магнитного резонанса, инфракрасная спектроскопия, ультрафиолетовая спектрофотометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография, газожидкостная хроматография, хромато-масс-спектрометрия.

**Положения, выносимые на защиту.**

- Результаты изучения физико-химических свойств 2-АБФПК, показатели и нормы качества субстанции.
- Результаты определения константы ионизации и коэффициента липофильности 2-АБФПК.
- Результаты разработки и валидации методик оценки качества субстанции по показателям «Подлинность» и «Количественное определение».
- Результаты исследований по разработке и валидации методики анализа «родственных примесей» в субстанции 2-АБФПК методом ВЭЖХ.
- Результаты разработки и валидации ГЖХ – методик для стандартизации субстанции 2-АБФПК по показателю «Остаточные органические растворители».
- Результаты разработки условий пробоподготовки и анализа 2-АБФПК в биологических жидкостях.

**Степень достоверности.** Достоверность исследований подтверждена объемом экспериментальных исследований, проведенных с использованием современных информативных физико-химических методов, таких как спектрофотометрия в УФ-области, ИК-спектрометрия и высокоэффективная жидкостная хроматография с УФ- и масс-спектрометрическим детектированием в соответствии с требованиями ГФ XV издания. Проведена статистическая обработка экспериментальных данных с использованием программного обеспечения «Microsoft Excel 2019» в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний».

**Апробация работы.** Основные результаты работы доложены на Всероссийской научно-практической онлайн-конференции с международным участием «Фармацевтическое образование СамГМУ. История, современность, перспективы» (Самара, 2021); I международной научно-практической конференции «Хроматография в химии, медицине и биологии: актуальные вопросы, достижения и инновации» (Кемерово, 2021); Всероссийской

онлайн-конференции с международным участием «Современные проблемы фармации» (Самара, 2022); Научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы химической безопасности в сфере фармацевтической и медицинской науки и практики» (Пермь, 2022); XIII Всероссийской научной конференции школьников, студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2023); Международной научно-практической конференции «Абу Али Ибн Сино и инновации в современной фармацевтике» (Ташкент, 2023); IX Международной научно – методической конференции «Фармообразование - 2023», посвященной 25-летию создания фармацевтического факультета в Воронежском государственном университете (Воронеж, 2023); II Международной научно – практической конференции «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы» (Томск, 2023).

**Личный вклад автора.** Все результаты эксперимента получены автором лично либо при его участии. Автором проведен весь спектр исследований, включая анализ литературы, разработку методик, статистическую обработку данных, обобщение результатов, подготовку материалов для статей и конференций.

**Связь темы диссертации с проблемным планом фармацевтических наук.** Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России. Номер государственной регистрации темы – 01.9.50 007417.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 3.4.2 – фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно п. 3 – разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления.

**Публикации.** Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 10 научных работах, в том числе в изданиях Перечня ВАК – 3.

**Объем и структура работы.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (6 глав), выводов, списка литературы, включающего 132 наименования (72 источника зарубежной литературы) и приложения. Работа изложена на 205 страницах машинописного текста, включает 57 таблиц, 62 рисунка.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### ФИЗИКО - ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ФАРМАКОПЕЙНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА СУБСТАНЦИИ 2-АБФПК

Субстанция 2-АБФПК представляет собой жёлтый мелкокристаллический порошок, без запаха, с температурой плавления в интервале от 215 до 217°C, легко растворимый в диметилсульфоксиде, растворимый в метаноле, умеренно растворимый в ацетонитриле, мало растворимый в этаноле, практически не растворимый в воде, н-гексане, толуоле, уксусной кислоте. По результатам анализа семи лабораторных серий субстанции 2-АБФПК были установлены следующие показатели качества: сульфатная зола – не более 0,10%; тяжелые металлы – не более 0,001%; потеря в массе при высушивании – не более 0,50%; вода (по К. Фишеру) – не более 0,50%.

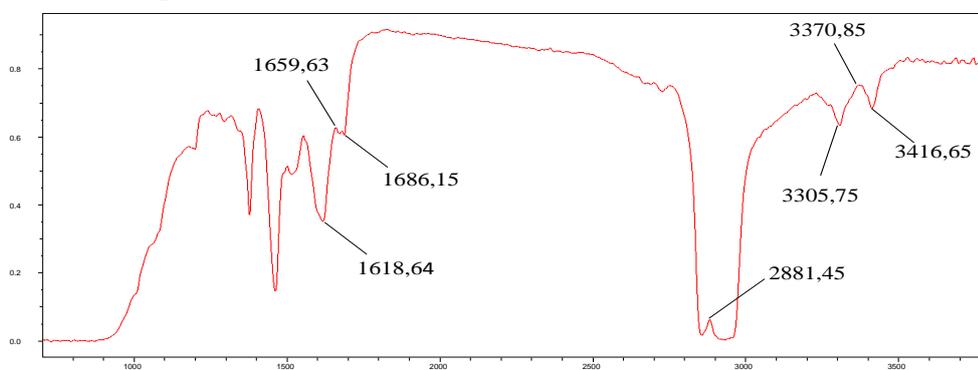
### **Микробиологическая чистота**

Микробиологическая чистота субстанции 2-АБФПК исследовалась в соответствии с требованиями ОФС.1.2.4.0002.18 для субстанций синтетического происхождения, предназначенных для производства нестерильных лекарственных препаратов (категория 2.2).

Установлено, что в 3 проанализированных образцах субстанции отсутствуют бактерии *Escherichia coli*, содержание аэробных микроорганизмов, плесневых и дрожжевых грибов соответствует требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации XV издания.

### **Изучение спектральных характеристик**

Спектрометрия в инфракрасной области. ИК-спектр субстанции 2-АБФПК (рисунок 1), снятый на универсальном лабораторном ИК-Фурье спектрометре «ФСМ-1201» в вазелиновом масле, содержит полосы поглощения  $\text{NH}_2$ -группы в области  $3416 - 3370 \text{ см}^{-1}$ , валентные колебания N-H незамещенной амидной группы в области  $3290 - 3305 \text{ см}^{-1}$ . Обнаруживаются валентные колебания карбониллов и C=C связей в области  $1659 - 1618 \text{ см}^{-1}$ .

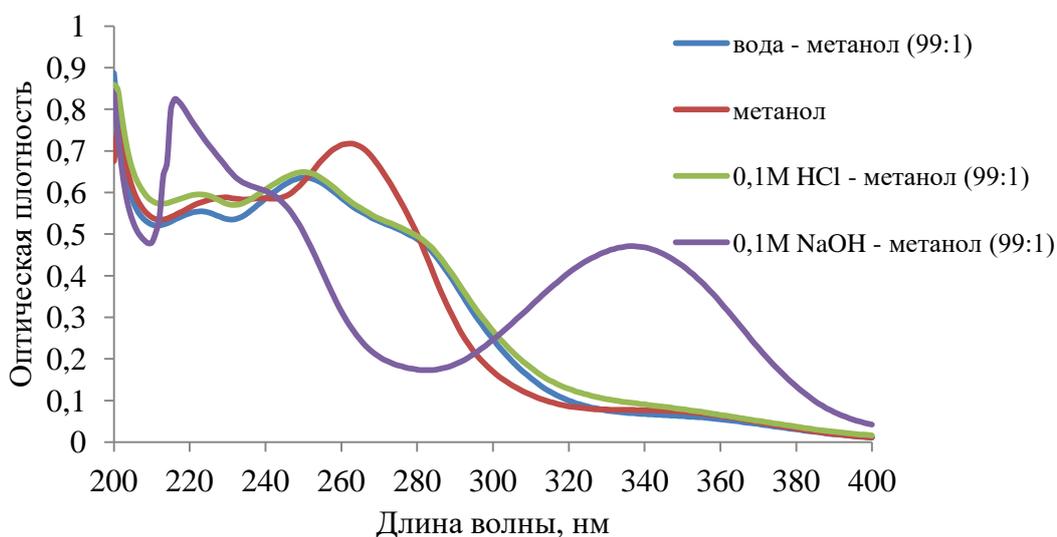


**Рисунок 1 – ИК-спектр 2-АБФПК**

Метод был включен в проект нормативной документации для оценки качества по показателю «Подлинность». *Нормативное требование:* инфракрасный спектр субстанции, снятый в вазелиновом масле в области от  $4000$  до  $400 \text{ см}^{-1}$  по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца 2-АБФПК.

Спектрофотометрия в ультрафиолетовой области. УФ-спектры 0,001% растворов 2-АБФПК снимали на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu) в диапазоне от 200 до 400 нм (рисунок 2). В качестве растворителей использовали метанол; воду очищенную; 0,1 М раствор кислоты хлористоводородной и 0,1 М раствор натрия гидроксида. Учитывая нерастворимость субстанции в воде и водных растворах кислот, данные растворы были приготовлены путем перерастворения из 0,1% раствора 2-АБФПК в метаноле.

УФ-спектры 2 АБФПК в «нейтральных» и «кислых» водно-метанольных растворах имеют 2 максимума поглощения – при 223 нм и 250 нм. В щелочном растворе (рН более 12) характер спектра соединения изменяется: появляются 2 выраженных максимума – при 216 нм и 336 нм. Такое изменение, вероятно, объясняется переходом соединения в имидольную форму за счет слабых кислотных свойств амидной группы. На наличие имидольной формы 2 АБФПК указывает и растворимость вещества в растворах сильных щелочей. Вследствие сольватохромного эффекта в УФ-спектре метанольного раствора 2 АБФПК в сравнении со спектрами «нейтральных» и «кислых» водных растворов наблюдается bathochromный сдвиг полос поглощения и значительное увеличение интенсивности поглощения во втором максимуме (263 нм).



**Рисунок 2 – УФ-спектры поглощения 2-АБФПК**

Метод УФ-спектрофотометрии включен в проект нормативной документации для оценки качества субстанции по показателю «Подлинность». *Нормативное требование:* УФ-спектр поглощения 0,001% метанольного раствора субстанции в области от 220 до 400 нм должен иметь максимум при  $(263 \pm 2)$  нм, минимум при  $(213 \pm 2)$  нм и плечо в интервале от  $(227 \pm 2)$  нм до  $(244 \pm 2)$  нм.

#### ***Изучение хроматографического поведения 2-АБФПК в режиме обращенно-фазной ВЭЖХ***

В исследованиях использовали жидкостный хроматограф «LC-20 Prominence» (Shimadzu) со спектрофотометрическим детектором. Изучение хроматографической подвижности соединения проводили на колонке с обращенно-фазным сорбентом Luna 5u C18(2) 100A ( $4,6 \times 250$  мм, 5 мкм), используя подвижные фазы на основе ацетонитрила и воды с добавлением модификаторов органической и неорганической природы. Апробированные составы элюентов представлены в таблице 1. Объектом исследования был метанольный раствор 2-АБФПК с концентрацией 200 мкг/мл. Анализ проводили в изократическом режиме при температуре термостата колонки  $40^\circ\text{C}$ . Скорость потока 1 мл/мин, объем вводимой пробы 10 мкл.

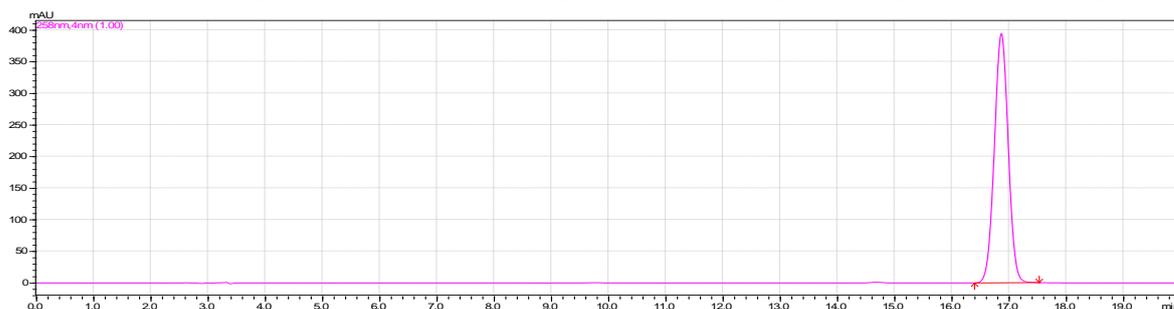
**Таблица 1 – Составы апробированных подвижных фаз**

Состав	Соотношение компонентов (%)
вода – ацетонитрил	40 – 60
фосфатный буфер (pH 6,8) – ацетонитрил	50 – 50
фосфатный буфер (pH 3,0) – ацетонитрил	60 – 40
0,1% раствор кислоты трифторуксусной – ацетонитрил	65 – 35

Установлено, что характер спектра 2-АБФПК не изменялся в апробированных элюентах различного состава с разными значениями pH. Максимум поглощения изучаемого соединения находился при  $258 \pm 2$  нм. Таким образом, для дальнейших исследований была выбрана длина волны детектирования 258 нм.

По результатам проведенного эксперимента по изучению хроматографической подвижности установлено, что исследуемое соединение хорошо удерживается на обращенно-фазном сорбенте при использовании всех выбранных элюентов. Оптимальный диапазон значений коэффициента ёмкости [ $2 > k > 10$ ] наблюдается при содержании ацетонитрила в

подвижной фазе от 50% до 35%. Фактор асимметрии хроматографического пика не превышал 1,5, что соответствует требованиям ГФ РФ. Пример хроматограммы представлен на рисунке 3.



**Рисунок 3 – Хроматограмма 2-АБФПК в подвижной фазе состава вода – ацетонитрил (60:40)**

Линейность отклика спектрофотометрического детектора соблюдалась в широком диапазоне концентраций 2-АБФПК (1 – 500 мкг/мл). Коэффициент корреляции ( $R^2$ ) калибровочного графика составил 0,9998.

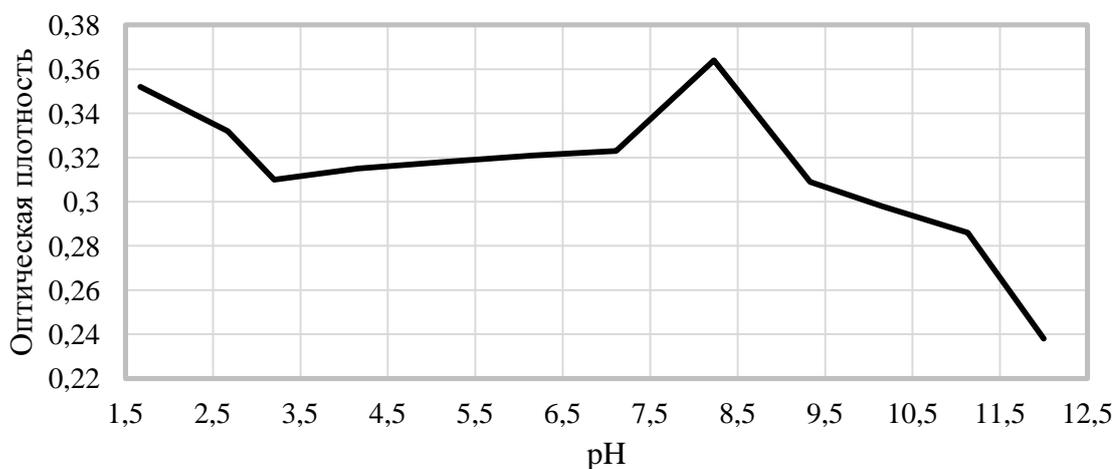
### **Определение констант ионизации 2-АБФПК**

Значения констант ионизации 2-АБФПК устанавливали двумя независимыми методами: УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ.

#### Метод УФ-спектрофотометрии

Результаты изучения характера спектра поглощения 2-АБФПК в растворах с различным значением рН среды были положены в основу спектрофотометрического определения константы ионизации 2-АБФПК. Учитывая плохую растворимость 2-АБФПК в воде, готовили исходный метанольный раствор субстанции с концентрацией 100 мкг/мл. Рабочие растворы с концентрацией 10 мкг/мл получали путем разведения исходного раствора буферным раствором с соответствующим рН.

Для предварительной оценки величины  $pK_a$  был использован метод определения точки «перегиба» на графике зависимости оптической плотности ( $\lambda=250$  нм) от рН раствора. В этом случае регистрировались УФ-спектры поглощения 2-АБФПК в широком диапазоне рН (от 1 до 12). Точка перегиба на кривой (рН  $\approx$  8) была принята за приблизительное значение константы ионизации (рисунок 4):



**Рисунок 4 – Оптическая плотность растворов 2-АБФПК при разных значениях рН**

Далее определяли точное значение рКа в узком интервале рН от 7,2 до 8,23 с шагом в 0,2 (таблица 2).

**Таблица 2 – Результаты определения рКа методом УФ – спектрофотометрии**

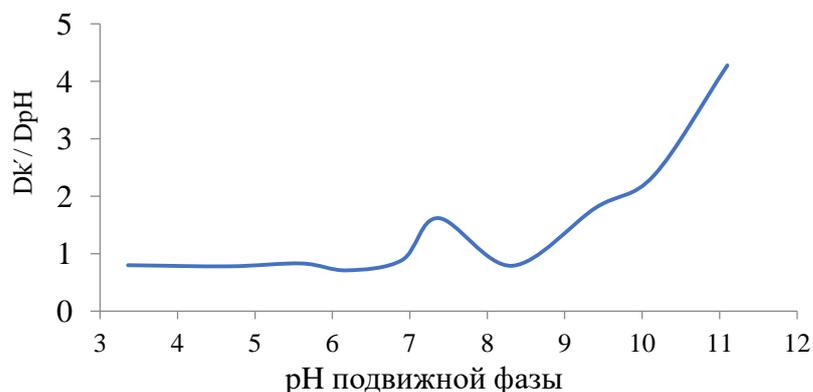
рН	Оптическая плотность при 250 нм (n = 3)	рКа	Оптическая плотность в крайних точках
7,2	0,401	7,53	$A_m$ (в 0,1М НСl) = 0,470 $A_i$ (в 0,1М NaOH) = 0,369
7,4	0,398	7,79	
7,6	0,407	7,82	
7,8	0,434	7,52	
8,02	0,445	7,54	
8,23	0,450	7,62	

Среднее значение рКа 2-АБФПК составило  $7,64 \pm 0,14$ .

### Метод ВЭЖХ-УФ

Определение рКа методом ВЭЖХ основано на различной способности ионизированных и неионизированных форм аналита удерживаться на обращенно-фазном сорбенте в зависимости от рН среды подвижной фазы. В качестве объекта исследования выступал метанольный раствор 2-АБФПК и нитрата калия (неудерживаемого компонента). Концентрация каждого из компонентов в растворе составила 100 мкг/мл.

Изократическое хроматографирование проводили на колонке Zorbax Extend-C18 (150×4,6 мм, 3,5 мкм) с использованием подвижной фазы состава ацетонитрил – фосфатный буфер (35:65). Исследования осуществляли в диапазоне рН элюентов от 2 до 11,5, рекомендованном для данной хроматографической колонки. По рассчитанным коэффициентам ёмкости 2-АБФПК строили график в координатах  $Dk'/DpH$  – рН (рисунок 5). Перегиб кривой в точке с рН 7,4 соответствует значению рКа 2-АБФПК.



**Рисунок 5 – Дифференциальная кривая для определения рКа 2-АБФПК методом ВЭЖХ**

Полученные значения рКа (7,64 методом УФ-спектрофотометрии и 7,40 методом ОФ-ВЭЖХ) сопоставимы и указывают на наличие свойств слабой кислоты за счет амидоимидольной таутомерии. Присутствие в молекуле «основного» центра (первичная аминогруппа, связанная с гетероциклом) определяет амфотерные свойства исследуемого соединения, и, следовательно, возможность существования нескольких констант ионизации. Однако доступными методами вторую константу определить не удалось. Вероятной причиной является недостижение уровня кислотности, необходимого для ионизации «основного» центра.

### Определение коэффициента липофильности ( $\log P$ ) 2-АБФПК

Метод встряхивания в колбе. Поскольку для 2-аминопирролкарбоксамидов не получены данные по липофильности, был произведен предварительный теоретический расчет  $\log P$  соединения 2-АБФПК с помощью доступных программ и сервисов (таблица 3).

**Таблица 3 – Теоретически рассчитанные значения  $\log P$  2-АБФПК**

Программа/сервис	Значение
FILTER-IT program	1,92
Swiss ADME	1,92
ALOGPS 2.1 program	2,50
Molinspiration Calculator of Molecular properties	1,61

Теоретический расчет показал, что значение  $\log P$  изучаемого соединения находится в интервале от -2 до 4 единиц, что позволяет использовать в экспериментальных исследованиях метод встряхивания. Определение коэффициента липофильности методом встряхивания проводилось согласно руководству OECD «Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method».

Водные растворы 2-АБФПК с концентрациями 50, 100 и 150 мкг/мл готовили путем перерастворения исходного метанольного раствора 2-АБФПК (10 мг/мл).

*Методика определения:* в пробирку типа Эппендорф помещали 1,0 мл водного раствора 2-АБФПК и соответствующий объем н-октанола. Используемые соотношения органической и водной фаз (октанол/вода) – 2:1; 1:1; 1:2. Образцы встряхивали на вихревом смесителе в течение 5 минут со скоростью 900 об/мин, затем центрифугировали в течение 10 минут при 15 000 об/мин для разделения водной и органической фаз. Концентрации 2-АБФПК в разделенных фазах определяли методом ВЭЖХ-УФ. Каждое экспериментальное значение  $\log P$  является средним четырех последовательных измерений (таблица 4).

**Таблица 4 – Экспериментально установленные значения  $\log P$  2-АБФПК (метод встряхивания)**

Соотношение октанол/вода	Концентрация 2-АБФПК, мкг/мл	$\log P$ ( $X_{cp.} \pm SD$ )
1:1 (1,0 мл : 1,0 мл)	50	1,35 $\pm$ 0,03
	100	1,32 $\pm$ 0,01
	150	1,32 $\pm$ 0,02
2:1 (2,0 мл : 1,0 мл)	50	1,55 $\pm$ 0,09
	100	1,51 $\pm$ 0,03
	150	1,56 $\pm$ 0,06
1:2 (0,5 мл : 1,0 мл)	50	1,84 $\pm$ 0,03
	100	1,92 $\pm$ 0,01
	150	1,84 $\pm$ 0,06

*Метод ОФ-ВЭЖХ.* Принцип определения  $\log P$  методом ВЭЖХ, согласно руководству OECD «Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method», заключается в установлении взаимосвязи между удерживанием вещества на колонке с обращенно-фазным сорбентом и его коэффициентом распределения в системе н-октанол/вода. Для этого осуществляют в аналогичных условиях хроматографирование референтных веществ с известной липофильностью и строят график зависимости  $\log P$  от логарифмов коэффициентов удерживания ( $\log k$ ). Референтные соединения выбирали таким образом, чтобы диапазон их  $\log$

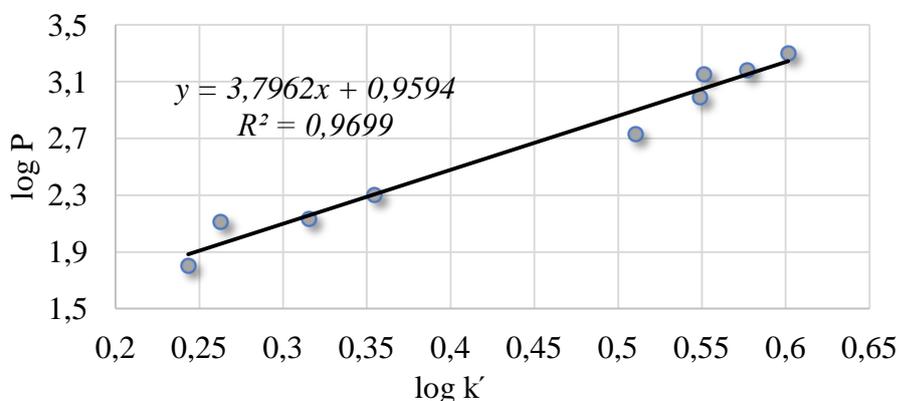
P включал ранее полученные результаты методом встряхивания в колбе и теоретические значения, рассчитанные с помощью специализированного программного обеспечения.

Для проведения эксперимента были приготовлены растворы эталонных соединений, калия нитрата и 2-АБФПК в подвижной фазе. Концентрация соединений в растворе составила 200 мкг/мл. ВЭЖХ-анализ проводили на обращенно-фазной колонке Luna C18(2) 100 А, 250×4,6 мм, 5 мкм (Phenomenex) с использованием подвижной фазы состава метанол – вода (70:30). По результатам эксперимента для каждого референтного соединения и 2 - АБФПК был рассчитан логарифм коэффициента удерживания (таблица 5).

**Таблица 5 – Логарифмы коэффициентов удерживания референтных соединений и 2 - АБФПК**

Соединение	log P	t <sub>R</sub> , мин.	t <sub>0</sub> (KNO <sub>3</sub> ), мин	log k'
2-нитрофенол	1,80	6,75	2,45	0,2433
Анизол	2,11	6,95		0,2630
Бензол	2,13	7,52		0,3155
Бензилхлорид	2,3	8,00		0,3548
Толуол	2,73	10,39		0,5102
Бромбензол	2,99	11,13		0,5488
Этилбензол	3,15	11,19		0,5516
Бензофенон	3,18	11,72		0,5771
Тимол	3,3	12,25		0,6015
2 - АБФПК		7,94		0,3458

С учетом полученных данных был построен график зависимости логарифма коэффициента липофильности соединений от логарифма коэффициента удерживания (рисунок 6).



**Рисунок 6 – График зависимости логарифма коэффициента липофильности от логарифма коэффициента удерживания**

Коэффициент корреляции графика составил  $R^2 = 0,9699$ , что соответствует требованиям Руководства OECD (более 0,9). Рассчитанное по уравнению графика линейной регрессии значение log P 2-АБФПК составило 2,27. Экспериментальные значения log P 2-АБФПК находятся в диапазоне от 1,32 до 2,27, что позволяет характеризовать изучаемое соединение как умеренно липофильное и предположить его достаточную биодоступность при пероральном применении.

## РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА СУБСТАНЦИИ 2-АБФПК ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ «ПОДЛИННОСТЬ» И «КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ»

### *Химические методы анализа*

2-АБФПК содержит в своей структуре ковалентно связанный атом брома, который может быть количественно определен аргентометрическим методом после предварительной минерализации. Для 2-АБФПК был опробован способ восстановительной минерализации водородом в момент выделения. Минерализацию проводили с использованием смеси цинкового высокодисперсного порошка (5 мкм, 99%) и калия гидроксида раствора 30%.

Нами были апробированы несколько способов индикации конечной точки титрования: методом Фаянса (адсорбционный индикатор – эозинат натрия, среда – уксуснокислая); методом Фольгарда в модификации Кольтгофа (индикатор – железоаммонийные квасцы, среда – азотнокислая); методом Мора (индикатор – калия хромат, среда – азотнокислая).

По результатам анализа серий субстанции 2-АБФПК, было установлено, титрование по варианту Фольгарда в модификации Кольтгофа приводит к завышенным результатам, количественное содержание (X, %) составило более 110%. Вариант титрования по Фаянсу показал более воспроизводимые результаты, однако X, % находилось в пределах 103 – 105%. Завышенные результаты количественного определения могут объясняться сложностью определения точки эквивалентности.

Использование метода Мора позволило достичь границ количественного содержания 2-АБФПК в разных сериях субстанций в пределах 99,1 – 100,7.

Таким образом, для количественного определения 2-АБФПК в субстанции нами предложена следующая *методика* аргентометрического титрования после предварительной минерализации:

250 мг 2-АБФПК (точная навеска) растворяют в 25 мл метанола, добавляют 10 мл калия гидроксида раствора 30% и 2 г порошка цинка, кипятят в течение 60 минут с обратным холодильником. После кипячения холодильник промывают 5 мл спирта 95% и продолжают кипячение в течение 5 минут. Суспензию охлаждают до комнатной температуры и фильтруют в мерную колбу на 50 мл через фильтр «синяя лента». Фильтр промывают 10 мл воды. Доводят рН фильтрата до 7 уксусной кислотой разведённой 30%. Раствор в колбе доводят водой очищенной до метки и перемешивают.

10,0 мл раствора помещают в коническую колбу на 100 мл, добавляют 0,25 мл калия хромата 5% и титруют 0,01М раствором серебра нитрата до перехода окраски в оранжево-жёлтую.

В результате валидации (таблица 6) доказано, что методика специфична, линейна в диапазоне от 80 до 120% от номинальной массы навески соединения (коэффициент корреляции ( $R^2$ ) более 0,99). Истинное значение открываемости (R,%) находится внутри доверительного интервала среднего результата количественного определения, что характеризует правильность методики. Относительное стандартное отклонение результатов количественного определения, полученными каждым из аналитиков (RSD,%), не превышает 1%, что свидетельствует об удовлетворительной сходимости методики. Рассчитанный критерий Фишера не превышает табличное значение, следовательно, различия между результатами определений, проведенных двумя аналитиками статистически незначимы.

**Таблица 6 – Результаты валидации аргентометрической методики количественного определения 2-АБФПК в субстанции**

Показатель	Результаты	
Специфичность	На титрование контрольного опыта расходуется не более 0,10 мл титранта, что не влияет на результаты количественного определения.	
Линейность	Диапазон: 200 – 300 мг	
	Коэффициент корреляции калибровочного графика: 0,9996	
Правильность	R ср. $\pm$ $\Delta$ R ср. = 99,84 $\pm$ 0,78%	
	Критерий Стьюдента $t_{\text{расчет.}} = 0,45 < t_{\text{табл.}} = 2,31$	
Прецизионность	RSD, %	
	1 аналитик 0,88%	2 аналитик 0,96%
	Критерий Фишера: $F_{\text{расчет.}} = 1,19 < F_{\text{табл.}} = 5,05$	

### Спектрофотометрия в УФ-области

Наличие выраженного максимума поглощения в спектре метанольного раствора 2-АБФПК ( $\lambda_{\text{max}}$  263нм), высокое значение показателя удельного поглощения ( $A^{1\%}_{1\text{см}} = 540$ ), а также стабильность значений оптической плотности (в течение 1 часа), позволило использовать собственное поглощение 2-АБФПК для разработки спектрофотометрической методики оценки качества субстанции по показателям «Подлинность» и «Количественное определение». Для количественного расчета 2-АБФПК в субстанции предложен метод внешнего стандарта.

*Условия спектрофотометрического анализа:* концентрация 2-АБФПК в испытуемом растворе и растворе стандартного образца: 0,001%; растворитель: метанол; аналитическая длина волны для количественного определения: 263 нм; толщина поглощающего слоя: 10 мм.

Для идентификации 2-АБФПК используют УФ-спектры. УФ-спектры поглощения стандартного раствора 2-АБФПК и испытуемого раствора в области от 220 до 400 нм должны иметь максимумы и минимумы при одних и тех же длинах волн.

Результаты валидационной оценки методики представлены в таблице 7.

**Таблица 7 – Результаты валидации методики количественного определения методом УФ-спектрофотометрии**

Показатель	Результаты	
Специфичность	Соответствие положений максимума поглощения при 263 нм, минимума при 213 нм и плато в области от 227 до 244 нм.	
Линейность	Диапазон: 0,0008% – 0,0012%	
	Уравнение графика: $A = 550 \cdot C - 0,009$	
	Коэффициент корреляции: 0,9991	
Правильность	R ср. $\pm$ $\Delta$ R ср. = 99,62 $\pm$ 0,65%	
	Критерий Стьюдента $t_{\text{расчет.}} = 1,36 < t_{\text{табл.}} = 2,31$	
Прецизионность	RSD, %	
	1 аналитик 0,55%	2 аналитик 0,32%
	Критерий Фишера: $F_{\text{расчет.}} = 2,95 < F_{\text{табл.}} = 5,05$	

Методика обладает специфичностью, линейностью в аналитическом диапазоне 8 – 12 мкг/мл, обеспечивает правильные и воспроизводимые результаты.

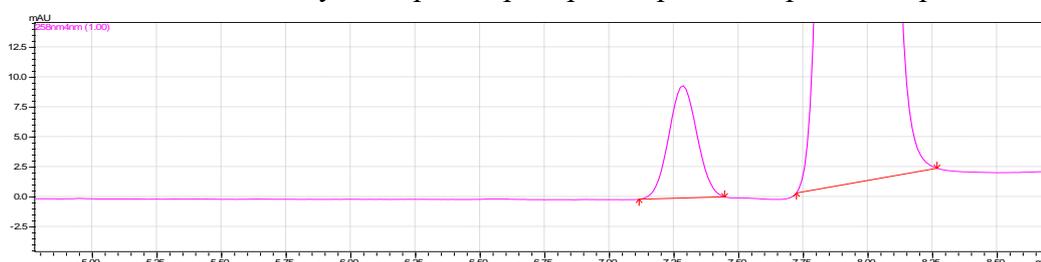
### Высокоэффективная жидкостная хроматография

Исследования по изучению хроматографического поведения 2-АБФПК на обращенно-фазном сорбенте, показали, что соединение элюируется в виде симметричного пика при использовании «кислых» и «нейтральных» элюентов с содержанием ацетонитрила в диапазоне

от 35 до 50%. В качестве подвижной фазы для разработки ВЭЖХ-методики была выбрана смесь ацетонитрил – фосфатный буфер (рН 6,8). С целью уменьшения времени анализа содержание органического компонента в хроматографической системе увеличили до 50%. Время удерживания 2-АБФПК составило 7,95 мин. Коэффициент разделения между пиком 2-АБФПК и пиком ближайшей примеси составил более 2,915 (рисунок 7). Следовательно, примесь не будет влиять на результаты количественного определения.

Разработанные хроматографические условия были положены в основу методики контроля качества субстанции 2-АБФПК по показателям «Подлинность» и «Количественное определение».

*Условия ВЭЖХ - анализа:* хроматографическая колонка Luna C18(2) 100 А (250×4,6 мм, 5 мкм) (Phenomenex) или аналогичная; подвижная фаза фосфатный буфер с рН 6,8 – ацетонитрил (50:50); режим элюирования изократический; температура термостата колонки 40°C; скорость потока 1 мл/мин; детектор спектрофотометрический, 258 нм; объем вводимой пробы 10 мкл. Концентрация 2-АБФПК в испытуемом растворе и растворе стандартного образца: 0,01%.



**Рисунок 7 – Хроматограмма метанольного раствора 2-АБФПК с концентрацией 200 мкг/мл**

Идентификация проводится совместно с количественным определением. Время удерживания пика 2-АБФПК на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика на хроматограмме стандартного раствора.

Результаты валидации методики количественного определения 2-АБФПК методом ВЭЖХ представлены в таблице 8.

**Таблица 8 – Результаты валидации методики количественного определения методом ВЭЖХ-УФ**

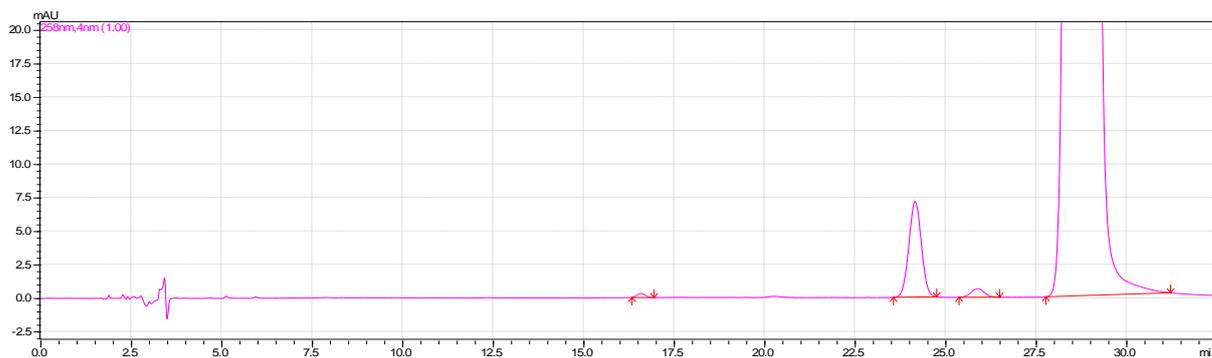
Показатель	Результаты	
<i>Специфичность</i>	На хроматограммах растворителя и подвижной фазы отсутствовали пики на времени удерживания пика 2-АБФПК.	
<i>Проверка пригодности хроматографической системы</i>	По результатам пятикратного хроматографирования раствора стандартного образца RSD площади пика 2-АБФПК составила 0,08%.	
<i>Линейность</i>	Диапазон: 80 – 120 мкг/мл	
	Уравнение графика: $S = 3733 \times C - 7897$	
	Коэффициент корреляции: 0,9998	
<i>Правильность</i>	$R \text{ ср.} \pm \Delta R \text{ ср.} = 99,86 \pm 0,72\%$	
	Критерий Стьюдента $t_{\text{расчет.}} = 0,45 < t_{\text{табл}} = 2,31$	
<i>Прецизионность</i>	RSD, %	
	1 аналитик 0,50%	2 аналитик 0,45%
	Критерий Фишера: $F_{\text{расчет.}} = 1,23 < F_{\text{табл}} = 5,05$	

Полученные при валидации результаты доказывают, что методика ВЭЖХ специфична, позволяет получать точные и воспроизводимые результаты в пределах аналитической области.

## РАЗРАБОТКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ РОДСТВЕННЫХ ПРИМЕСЕЙ И ОСТАТОЧНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

### Определение родственных примесей методом ВЭЖХ

При анализе метанольного раствора с высокой концентрацией 2-АБФПК (2 мг/мл) с использованием подвижной фазы состава фосфатный буфер с рН 6,8 – ацетонитрил на хроматограмме наблюдали наличие пиков примесей. Наиболее четкое разделение хроматографического пика основного вещества и пиков примесей наблюдалось при содержании 35 % ацетонитрила в элюенте. Детектирование проводили при длине волны 258 нм. Соответствующая хроматограмма представлена на рисунке 8. Пригодность предлагаемых условий ВЭЖХ для разделения родственных примесей в субстанции соединения подтверждается удовлетворительными значениями показателей разрешения ( $R_s$ ), эффективности хроматографической системы ( $N$ ), симметрии пиков ( $A_s$ ) (таблица 9).



**Рисунок 8 – Хроматограмма метанольного раствора 2-АБФПК (2 мг/мл)**

**Таблица 9 – Параметры пригодности хроматографических условий**

Разделяемые компоненты	$t_R$ , мин	RRT	$A_s$	$R_s$	N, ТТ
Примесь 1	16,84	0,60	1,00	--	23 241
Примесь 2	23,85	0,85	1,02	13,06	22 798
Примесь 3	25,53	0,91	1,03	2,58	23 370
2-АБФПК	28,17	1,00	0,97	3,73	22 681

Примесь 1 была идентифицирована как 4-броманилин (4-БА), который используется на одной из стадий синтеза субстанции. Идентификация проводилась по совпадению времен удерживания пиков 4-БА на хроматограмме его стандартного раствора и хроматограмме испытуемого раствора 2-АБФПК, а также совпадению УФ-спектров.

Учитывая высокое содержание неидентифицированных примесей, было принято решение провести дополнительную очистку субстанции с помощью перекристаллизации из горячего ацетонитрила. Очищенная таким образом субстанция была повторно проанализирована по показателю «Родственные примеси». Установлено, что после дополнительной очистки содержание примеси с RRT 0,85 снижается более чем в 2 раза, примесь с RRT 0,91 не обнаруживается.

Условия анализа родственных примесей: хроматографическая колонка Luna C18(2) 100 А (250×4,6 мм, 5 мкм) или аналогичная; подвижная фаза – фосфатный буфер с рН 6,8 – ацетонитрил (65:35); режим элюирования изократический; температура термостата колонки 40 °С; скорость потока 1 мл/мин; детектор спектрофотометрический, длины волн детектирования: 258 нм – при анализе неидентифицированных примесей, 240 нм при анализе идентифицированной примеси 4-броманилина; объем вводимой пробы 10 мкл. Концентрация 2-АБФПК в испытуемом растворе –

2 мг/мл. Для оценки содержания идентифицированной примеси предложен расчет по стандартному раствору 4-броманилина (2 мкг/мл), для неидентифицированных примесей – расчет с использованием в качестве раствора сравнения разведение основного соединения (2 мкг/мл).

Результаты валидации методики определения родственных примесей методом ВЭЖХ представлены в таблице 10.

**Таблица 10 – Результаты валидации методики определения родственных примесей методом ВЭЖХ-УФ**

Показатель	Результаты		
<i>Специфичность</i>	На хроматограммах подвижной фазы и растворителя, снятых при 258 и 240 нм, отсутствуют пики, близкие ко временам удерживания пиков 2-АБФПК, 4-БА и ранее обнаруженных неидентифицированных примесей. Используемая хроматографическая система полностью разделяет пики исследуемого вещества, 4-броманилина, пики неидентифицированных примесей и возможных продуктов деструкции 2-АБФПК. Разрешение ( $R_s$ ) для критичных пар пиков на всех хроматограммах составляет более 1,5.		
<i>Проверка пригодности хроматографической системы</i>	По результатам пятикратного хроматографирования раствора стандартного образца RSD площади пика 2-АБФПК составил 0,35%, RSD площади пика 4-БА – 0,13%.		
<i>Линейность</i>		2-АБФПК	4-БА
	<i>Диапазон</i>	0,25 – 8 мкг/мл	0,20 – 2,40 мкг/мл
	<i>Уравнение графика</i>	$S = 35535,85 \cdot C + 3209,97$	$S = 17306,19 \cdot C + 1379,65$
	<i>Коэффициент корреляции</i>	0,9993	0,9995
<i>Предел количественного определения</i>	Для 2-АБФПК 0,25 мкг/мл, для 4-БА – 0,20 мкг/мл		
<i>Правильность (4-БА)</i>	$R_{\text{ср.}} \pm \Delta R_{\text{ср.}} = 99,17 \pm 1,02\%$		
	Критерий Стьюдента $t_{\text{расчет.}} = 1,73 < t_{\text{табл}} = 2,13$		
<i>Прецизионность (4-БА)</i>	RSD, %		
	1 аналитик 4,59%	2 аналитик 6,04%	
	Критерий Фишера: $F_{\text{расчет.}} = 1,85 < F_{\text{табл}} = 5,05$		

С помощью разработанной и валидированной методики были проанализированы 4 серии субстанции изучаемого соединения на наличие «родственных примесей». Результаты анализа представлены в таблице 11.

**Таблица 11 – Содержание «родственных примесей» в субстанции 2-АБФПК, %**

Серия	4-БА	Примесь (RRT 0,85)	Любая другая неидентифицированная примесь	Общее содержание примесей
0521	0,075	0,14	0,03	0,245
0122	0,028	0,21	–	0,238
0922	0,044	0,19	0,02	0,254
0223	0,019	0,24	0,02	0,279

По результатам определения содержания примесей в четырех сериях субстанции 2-АБФПК установлены следующие предельные нормы: 4-БА не более 0,1%, неидентифицированной примеси (RRT 0,85) – не более 0,3%, единичной неидентифицированной примеси – не более 0,1%, сумма примесей – не более 0,5%.

#### *Изучение строения примеси с RRT 0,85 методом ВЭЖХ-МС/МС*

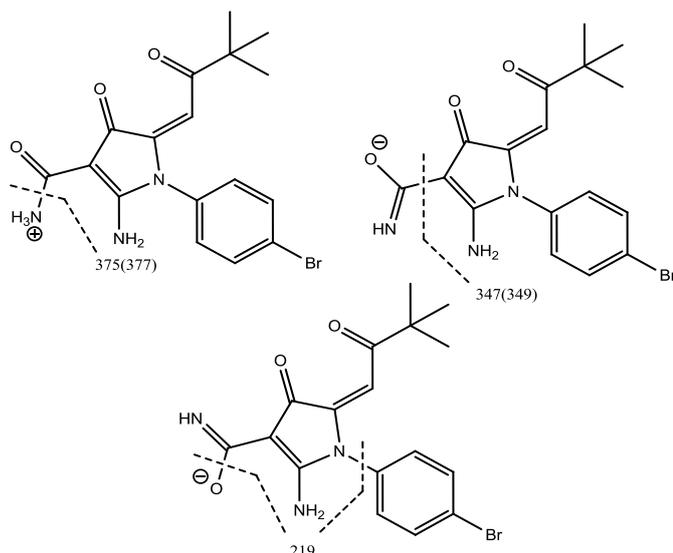
В ходе анализа серий субстанции на содержание примесей было установлено, что, несмотря на очистку, примесь с RRT 0,85 присутствует во всех сериях субстанции, причем ее содержание в некоторых образцах превышает 0,2%. Нами была предпринята попытка установить природу данной примеси с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС.

Исследования проводили на жидкостном хромато-масс-спектрометре «LCMS-8050» (Shimadzu) с детектором типа тройной квадруполь. Условия хроматографического анализа: обращенно-фазная колонка: «Luna 3 мкм C18(2) 100 А» («Phenomenex») размером 150×3,0 мм; подвижная фаза: ацетонитрил – 0,1% раствор муравьиной кислоты (50:50); скорость потока элюента: 0,25 мл/мин; температура термостата колонки: 40° С.

Масс-спектрометрические условия: тип ионизации: электроспрей (+/-); напряжение на капилляре: 4000 В; температура интерфейса: 300 °С; температура нагреваемого блока: 300 °С; температура линии десольватации 250 °С; поток газа-распылителя: 2 л/мин; поток газа-осушителя: 10 л/мин; поток нагреваемого газа: 10 л/мин.

При разработке условий масс-спектрометрического детектирования 2-АБФПК были получены масс-спектры 2-АБФПК в режимах сканирования положительных и отрицательных ионов. Анализ полученных масс-спектров 2-АБФПК показал наличие интенсивных ионов со значениями  $m/z$  392 и 394 в режиме положительной ионизации, 390 и 392 – в режиме отрицательной ионизации. Данные сигналы соответствуют протонированным  $[M+H]^+$  и депротонированным  $[M-H]^-$  молекулам изучаемого соединения. Дуплет сигналов в масс-спектрах объясняется присутствием в структуре изучаемого соединения атома брома, состоящего из двух стабильных изотопов с массами 79 и 81.

Далее были получены масс-спектры фрагментных ионов. Ионами-предшественниками являлись молекулярные ионы с  $m/z$  392 и 394 в режиме положительной ионизации, 390 и 392 – при отрицательной ионизации. Анализ вторичных масс-спектров показал, что в режиме положительной ионизации наиболее интенсивными фрагментными ионами оказались ионы с  $m/z$  375 (377), при сканировании отрицательных ионов в спектре наблюдали интенсивные сигналы от фрагментов с массами 219 и 347 (349). Исходя из величин  $m/z$  полученных фрагментных ионов, нами были предложены следующие схемы фрагментации молекулярных ионов 2-АБФПК (рисунок 9).



**Рисунок 9 – Предполагаемые схемы фрагментации молекулярных ионов 2-АБФПК**

Следующим этапом работы стал анализ метанольного раствора «неочищенной» субстанции 2-АБФПК с концентрацией 20 мкг/мл. Для более эффективного разделения примесей и основного соединения концентрацию ацетонитрила снизили до 35%. Снимали хроматограммы раствора в режиме селективного ионного мониторинга, пропускавая ионы с массой 392 и 394 в режиме положительной ионизации, с массой 390 и 392 – в режиме отрицательной ионизации. Наблюдали наличие примесей с относительными временами удерживания 0,85 и 0,91.

Установлено, что в масс-спектрах примеси с RRT 0,85 присутствуют интенсивные ионы с такими же  $m/z$ , как и у 2-АБФПК как в режиме положительной, так и в режиме отрицательной ионизации. Наблюдается характерный дуплет сигналов, что подтверждает наличие 4-бромфенильного заместителя в структуре примеси. Вторичные масс-спектры примеси RRT 0,85 также демонстрируют интенсивные сигналы от фрагментных ионов с теми же  $m/z$  как в режиме положительной, так и в режиме отрицательной ионизации.

Таким образом, в масс-спектрах примеси 2-АБФПК с RRT 0,85 наблюдается те же молекулярные ионы и в режиме положительной, и в режиме отрицательной ионизации. Вторичные масс-спектры примеси подтверждают аналогичный 2-АБФПК характер фрагментации. Учитывая способность производных 2-АПКК к существованию в виде геометрических изомеров, можно предположить, что неидентифицированная примесь является Z – изомером 2-АБФПК.

#### **Определение остаточных органических растворителей (ООР) методом ГЖХ**

Схема синтеза и очистки субстанции 2-АБФПК предусматривает использование органических растворителей, относящихся к разным классам токсичности (таблица 12).

**Таблица 12 – Органические растворители, используемые при синтезе 2-АБФПК**

Растворитель	Класс токсичности	Предельное содержание, ppm
Бензол	1	2
Ацетонитрил	2	410
Этанол	3	5000
Диэтиловый эфир	3	5000
Триэтиламин	3	5000

Разработку ГЖХ-методик определения ООР проводили на хроматографе «Хроматэк-Кристалл 5000.2» с пламенно-ионизационным детектором, используя стандартные растворы бензола, ацетонитрила, этанола, диэтилового эфира и триэтиламина в диметилформамиде.

Учитывая очень низкий нормируемый предел содержания в субстанциях, для извлечения бензола из раствора был предложен вариант статической парофазной экстракции. Для остальных соединений использовался прямой ввод растворов в инжектор.

Исследования показали, что хорошее разделение пиков бензола, ацетонитрила, этанола и диэтилового эфира обеспечивается при хроматографировании на колонке НР-FFAP (НФ – полиэтиленгликоль, модифицированный нитротерефталевой кислотой). Значения коэффициентов симметрии пиков указанных соединений не превышали 2,0. Однако пик триэтиламина на данной колонке имел крайне асимметричную форму. Удовлетворительную симметрию пика триэтиламина удалось достичь на колонке НР-5 (НФ – (5%-фенил)-метилполисилоксан). Нами предложены три отдельные методики для определения ООР в субстанции 2-АБФПК (таблица 13).

**Таблица 13 – Хроматографические условия определения ООР**

Условия	Этанол, диэтиловый эфир, ацетонитрил	Триэтиламин	Бензол
Колонка	НР-FFAP	НР-5	НР-FFAP
Газ – носитель	азот		
Деление потока	1/10	1/15	1/15
Давление газа-носителя	40 кПа	60 кПа	45 кПа
Детектор	ПВД		
Температура термостата	50° С в течение 2 минут, затем со скоростью 5°С/мин до 120 °С, затем со скоростью 45 °С/мин до 210 °С	70° С в течение 4 минут, затем со скоростью 25°С/мин до 150 °С	55° С в течение 1 минуты, затем со скоростью 10°С/мин до 150 °С, затем со скоростью 25°С/мин. до 210 °С
Температура инжектора	180 °С	230 °С	210 °С
Температура детектора	230 °С	250 °С	240 °С
Скорость подачи: воздуха водорода	350 мл/мин 35 мл/мин	400 мл/мин 40 мл/мин	420 мл/мин 42 мл/мин
Температура и время термостатирования	–	–	80° С, 15 мин
Температура крана	–	–	80° С

В процессе валидации установлено, что методики определения остаточных растворителей методом ГЖХ обладают необходимой чувствительностью, специфичностью, линейностью, правильностью и прецизионностью. Анализ трех серий субстанций 2-АБФПК показал, что уровень ООС не превышает нормируемых пределов содержания: бензол – не более 2 ppm; ацетонитрил – не более 410 ppm; этанол, диэтиловый эфир, триэтиламин – не более 5000 ppm.

## РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ 2-АБФПК В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

Для извлечения 2-АБФПК из плазмы крови был опробован простейший способ пробоподготовки – осаждение белков плазмы органическим растворителем.

*Условия пробоподготовки:* объем плазмы крови – 200 мкл; объем органического растворителя (ацетонитрила, метанола) – 300 мкл; время встряхивания (1500 об/мин) – 5 минут; время центрифугирования (10 000 об/мин) – 10 минут; объем инжестируемой пробы – 50 мкл. Концентрацию 2-АБФПК в извлечениях определяли, используя ранее разработанные ВЭЖХ-условия для количественного анализа соединения в субстанции.

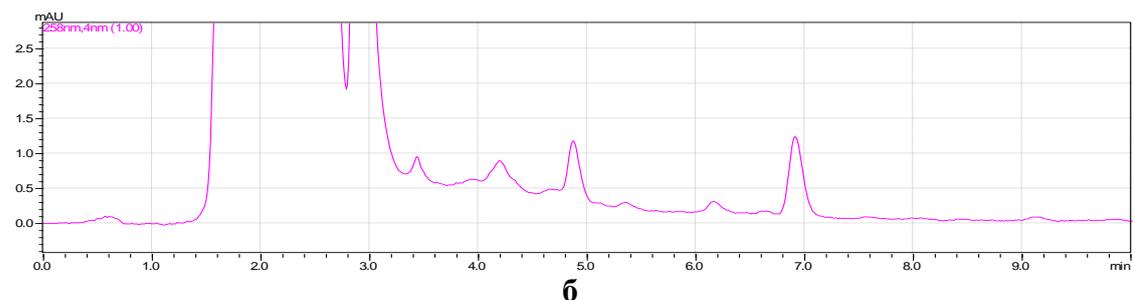
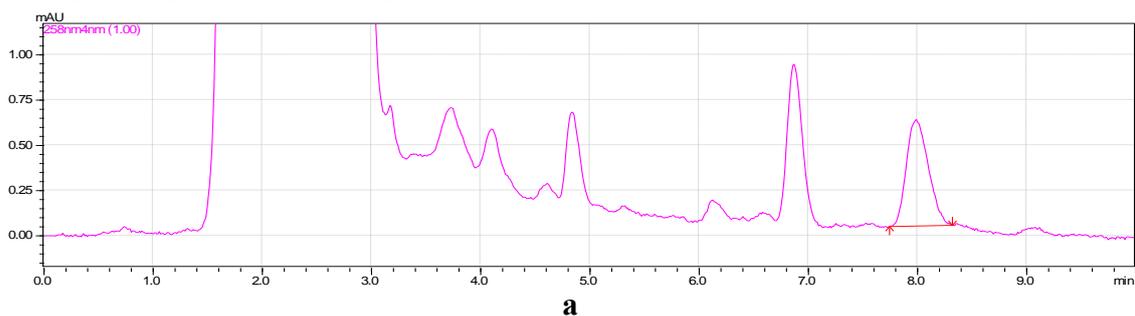
По итогам эксперимента в качестве оптимального экстрагента был выбран ацетонитрил, поскольку обеспечил более эффективное извлечение 2-АБФПК из модельных смесей плазмы, чем метанол (таблица 14).

**Таблица 14 – Оценка эффективности экстракции 2-АБФПК из плазмы крови**

<i>Осадитель</i>	<i>Концентрация 2-АБФПК в модельной смеси, мкг/мл</i>	<i>Степень извлечения, % (<math>X_{cp} \pm SD, n = 6</math>)</i>
Метанол	10	72,09 ± 0,89
Ацетонитрил	10	98,86 ± 1,65
	5	99,22 ± 0,85
	1	95,72 ± 2,89

Пробоподготовку мочи осуществляли путем разбавления биожидкости ацетонитрилом (1:1) с последующим центрифугированием. Процент извлечения 2-АБФПК из модельных смесей составил более 95% на всех уровнях концентраций исследуемого соединения.

Валидацию проводили в соответствии с требованиями, предъявляемыми к биоаналитическим методикам. Специфичность разработанных методик была оценена на биообъектах, полученных из разных источников: плазма крови, моча лабораторных животных (крысы, кролика) и человека. Установлено, что в извлечениях «холостых» проб отсутствуют пики эндогенных соединений, близкие к времени удерживания 2-АБФПК. Примеры хроматограмм представлены на рисунке 10.



**Рис. 10 – Хроматограммы модельной смеси плазмы крови с концентрацией 2-АБФПК на уровне НПКО: 0,1 мкг/мл (а) и «холостой» плазмы крови (б)**

Линейность, правильность и прецизионность методик доказывали путем анализа модельных смесей: калибровочных стандартов и образцов контроля качества (таблица 15).

**Таблица 15 – Результаты определения линейности, правильности и прецизионности методик определения 2-АБФПК в биожидкостях**

Плазма крови				Моча			
Линейность							
Концентрации калибровочных стандартов: 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5; 8,0; 10,0 мкг/мл. НПКО: 0,1 мкг/мл. Уравнение калибровочного графика: $S = 77274,71 \times C - 650,4374$ Коэффициент корреляции: 0,9999				Концентрации калибровочных стандартов: 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5; 8,0; 10,0 мкг/мл. НПКО: 0,25 мкг/мл. Уравнение калибровочного графика: $S = 46603,03 \times C - 2374,591$ Коэффициент корреляции: 0,9976			
Правильность и прецизионность (n=6)							
Концентрации образцов контроля качества	$\bar{x}$	RSD, %	$\epsilon$ , %	Концентрации образцов контроля качества	$\bar{x}$	RSD, %	$\epsilon$ , %
0,10	0,099	12,12	-1,00	0,25	0,269	5,20	7,60
0,30	0,298	6,38	-0,67	0,75	0,735	9,93	-2,00
4,09	3,935	9,33	-3,79	3,50	3,516	5,92	0,46
8,18	8,561	7,55	4,66	8,75	8,564	1,95	-1,10

Коэффициенты корреляции калибровочных графиков составили более 0,99, значения величин относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности ( $\epsilon$ , %) результатов анализа образцов контроля качества, не превышают 15% для всех концентраций, включая НПКО. Таким образом, разработанные биоаналитические методики специфичны, линейны, обладают удовлетворительными показателями по валидационным параметрам «правильность» и «прецизионность».

## ВЫВОДЫ

- По результатам изучения физико-химических свойств биологически активного соединения 2-АБФПК определены и нормированы показатели доброкачественности субстанции. Субстанция представляет собой желтый мелкокристаллический порошок с температурой плавления в интервале от 215 до 217°C, легко растворимый в диметилсульфоксиде, растворимый в метаноле, практически не растворимый в воде. Содержание неспецифичных примесей соответствует фармакопейным требованиям: сульфатной золы – не более 0,1%, тяжелых металлов – не более 0,001%, потеря в массе при высушивании не превышает 0,5%. Микробиологическая чистота субстанции соответствует категории 2.2.
- Изучены спектральные характеристики 2-АБФПК в УФ- и ИК- областях. Установлено, что характер УФ-спектра соединения зависит от pH среды и природы растворителя: максимумы поглощения «нейтральных» и «кислых» растворов соединения находятся при 223 нм и 250 нм, в «щелочных» растворах – при 216 нм и 336 нм. В метанольном растворе наблюдается батохромный сдвиг полос поглощения и увеличение интенсивности поглощения во втором максимуме. Наличие собственного поглощения 2-АБФПК позволяет использовать метод УФ-спектрофотометрии в качественном и количественном анализе соединения, а также как способ детектирования в ВЭЖХ. В ИК-спектре соединения обнаруживаются характеристические полосы поглощения  $\text{NH}_2$ -группы (3416 – 3370  $\text{cm}^{-1}$ ), N-H незамещенной амидной группы (3290 – 3305  $\text{cm}^{-1}$ ), карбонил и C=C связей (1659 – 1618  $\text{cm}^{-1}$ ). ИК-спектрометрия рекомендована для подтверждения подлинности субстанции.

3. Установлено, что 2-АБФПК элюируется в виде симметричного пика с приемлемым удерживанием [ $2 < k < 9$ ] на ВЭЖХ-колонке с обращенно-фазным сорбентом при содержании ацетонитрила в подвижной фазе от 35% до 50%. Подтверждена линейность отклика спектрофотометрического детектора в широком диапазоне концентраций 2-АБФПК (1-500 мкг/мл).
4. Методами УФ-спектрофотометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии определены показатель ионизации и коэффициент липофильности 2-АБФПК. Полученные данные позволяют характеризовать 2-АБФПК как умеренно липофильное соединение с наличием слабокислотных свойств.
5. Для количественного определения 2-АБФПК в субстанции разработаны методики на основе УФ-спектрофотометрии, обращенно-фазной ВЭЖХ, а также методика аргентометрического титрования по ковалентно связанному атому брома. Разработанные методики специфичны, линейны (коэффициент корреляции  $R^2$  более 0,999), позволяют получать воспроизводимые результаты. Открываемость 2-АБФПК с учетом доверительных интервалов составила  $99,84 \pm 0,78\%$  (аргентометрия);  $99,62 \pm 0,65\%$  (УФ-спектрофотометрия);  $99,86 \pm 0,72\%$  (ВЭЖХ-УФ). Методы УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ рекомендованы и для установления подлинности субстанции.
6. Выбраны оптимальные условия разделения родственных примесей в субстанции 2-АБФПК методом ВЭЖХ-УФ в подвижной фазе состава фосфатный буфер (рН 6,8) – ацетонитрил (65:35). Для оценки содержания идентифицированной примеси (4-броманилина) предложен расчет по стандартному раствору 4-броманилина, для неидентифицированных примесей – расчет с использованием в качестве раствора сравнения разведение основного соединения. Методики характеризуются высокой чувствительностью, линейны в диапазоне от 0,0125 до 0,4% от содержания 2-АБФПК в испытуемом растворе – для неидентифицированных примесей, и от 0,01 до 0,12 % – для 4-броманилина. Результаты оценки правильности и прецизионности методик удовлетворяют требованиям ГФ РФ.
7. Разработаны и валидированы высокочувствительные и специфичные методики определения остаточных органических растворителей (диэтилового эфира, этанола, ацетонитрила, триэтиламина и бензола) в субстанции 2-АБФПК методом ГЖХ-ПВД на капиллярных колонках различной полярности (НР-5, НР-FFAP). Анализ трех серий субстанций 2-АБФПК показал, что уровень ООР не превышает нормируемых пределов содержания: бензола – не более 2 ppm; ацетонитрила – не более 410 ppm; этанола, диэтилового эфира, триэтиламина – не более 5000 ppm.
8. С использованием комплекса разработанных аналитических методик проведено исследование лабораторных образцов субстанции 2-АБФПК, установлены нормы по показателям «Родственные примеси», «Остаточные органические растворители», «Количественное определение».
9. Для целей исследования фармакокинетики 2-АБФПК разработаны и валидированы методики определения 2-АБФПК в плазме крови и моче методом ВЭЖХ-УФ. Установлено, что предложенные варианты пробоподготовки биообъектов (преципитация белков плазмы крови, разведение мочи ацетонитрилом) обеспечивают извлечение более 95% соединения из модельных смесей. Специфичность хроматографических условий подтверждена на образцах биожидкостей, полученных от лабораторных животных разного вида и человека. Нижний предел количественного определения 2-АБФПК в биологических жидкостях составил 0,1 мкг/мл (для плазмы крови), 0,25 мкг/мл (для мочи).

**Основные положения диссертационной работы опубликованы:**

1. Цечёев А.Т. Метод УФ-спектрофотометрии в анализе нового производного 2-аминопиррола с противоопухолевой активностью / А.Т. Цечёев, Ю.Н. Карпенко, Н.М. Игидов // **Вопросы обеспечения качества лекарственных средств.** – 2022. – № 2 (36). – С.4-10.
2. Цечёев А.Т. Выбор условий хроматомасс-спектрометрического определения нового производного 2-аминопиррола с цитотоксической активностью / А.Т. Цечёев, Ю.Н. Карпенко, Е.Ю. Тумилович, Н.М. Игидов // **Медицинский вестник Башкортостана.** – 2022. – Т. 17. – № 3(99). – С.32-37.
3. Цечёев А.Т. Применение методов УФ-спектрофотометрии и обращенно-фазной ВЭЖХ для определения константы ионизации нового биологически активного соединения / А.Т. Цечёев, Ю.Н. Карпенко // **Аспирантский вестник Поволжья.** – 2023. – Т. 23. – № 2. – С.60-65.
4. Цечёев А.Т. Разработка условий ВЭЖХ для оценки качества нового биологически активного соединения с цитотоксической активностью / А.Т. Цечёев, Карпенко Ю.Н. // Всероссийская научно-практическая онлайн-конференция с международным участием «Фармацевтическое образование СамГМУ. История, современность, перспективы», посвященная 50-летию фармацевтического образования СамГМУ (Самара, 26-27 октября 2021 г.): Сборник материалов – Самара: ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2021 – С.185-190.
5. Цечёев А.Т. Использование метода ВЭЖХ при определении коэффициента липофильности нового биологически активного соединения с цитотоксической активностью / А.Т. Цечёев, Ю.Н. Карпенко // Хроматография в химии, медицине и биологии: актуальные вопросы, достижения и инновации : материалы I Международной научно-практической конференции, посвященной памяти профессора П. В. Кузнецова (Кемерово, 26 ноября 2021 г.) / отв. ред. Е. М. Мальцева, А. С. Сухих. – Кемерово: КемГМУ, 2021. – С.132-136.
6. Цечёев А.Т. Хроматографическое определение коэффициента липофильности биологически активного производного 2-аминопиррола / А.Т. Цечёев, Ю.Н. Карпенко // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. Научно-практическая конференция международным участием «Актуальные проблемы безопасности в сфере фармацевтической и медицинской науки и практики», посвященная 50-летию кафедры токсикологической химии: Сборник материалов (14 – 15 декабря 2022 года). – Пермь, 2022 – С.75-78.
7. Цечёев А.Т. Метод осадительного титрования в анализе биологически активного соединения, производного 2-аминопиррола / А.Т. Цечёев, Ю.Н. Карпенко // Итоги конкурсной программы научных работ XIII Всероссийской научной конференции школьников, студентов и аспирантов с международным участием. Сборник материалов конференции. – Санкт-Петербург, 2023 – С.373-376.
8. Цечёев А.Т. Оценка специфичности методики определения родственных примесей в субстанции нового биологически активного соединения, производного 2-аминопиррола / А.Т. Цечёев, Ю.Н. Карпенко // Сборник материалов VI международной научно-практической конференции на тему Абу Али Ибн Сино и инновации в современной фармацевтике (18 мая 2023 г.). – Ташкент, 2023. – С.174.
9. Цечёев А.Т. Разработка и валидация методики определения производного 2-аминопирролкарбоновой кислоты в плазме крови / А.Т. Цечёев, Ю.Н. Карпенко // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств : Сборник трудов 9-ой Международной научно-методической конференции «Фармообразование-2023». – Воронеж, 2023 – С.415-420.
10. Цечёев А.Т. Валидация методики количественного определения нового биологически активного соединения с противоопухолевой активностью / А.Т. Цечёев, Ю.Н. Карпенко // Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы. II Международная научно-практическая конференция (г. Томск, 04-06 октября 2023 г.): сборник материалов; под ред. М.В. Белоусова. – Томск: Изд-во СибГМУ, 2023. – С.96-99.