

## РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОСТОРОННИХ ПРИМЕСЕЙ В СУБСТАНЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО СОЕДИНЕНИЯ КОН-1

Карпенко Ю.Н.<sup>1</sup>, Кляшева О.Н.<sup>1</sup>, Ярыгина Т.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Пермь, Россия (614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2), e-mail: [perm@pfa.ru](mailto:perm@pfa.ru)

Синтезировано новое биологически активное соединение из группы производных 3-гидрокси-3-пирролин-2-она КОН-1, превосходящее по антиамнестическому действию пираретам. Посторонние примеси (исходные продукты синтеза) - метиловый эфир ацетилпировиноградной кислоты (МЭАПВК) и 4-бромбензальдегид (ББА) определяли обращённо-фазной ВЭЖХ. Анализ проводили на колонке C18 (25 см×4,6 мм, сорбент Discovery® C18 с размером частиц 5 мкм). Подвижная фаза: фосфатный буфер (рН 7) – ацетонитрил; режим элюирования – градиентный; длина волны детектирования – 310 нм (для МЭАПВК), 260 нм (для ББА). Линейность разработанной методики определяли на пяти уровнях концентраций МЭАПВК и ББА в пределах 0,05-1,0% от содержания основного вещества - субстанции КОН-1. Пределы обнаружения и количественного определения МЭАПВК составили соответственно 0,8 мкг/мл и 1,5 мкг/мл; для ББА - 0,3 мкг/мл и 0,5 мкг/мл. Оценку внутрилабораторной повторяемости методики проводили в пределах концентраций МЭАПВК и ББА 2-15 мкг/мл. Относительное стандартное отклонение не превышает 10,0%. Определение правильности методики проводили на трех уровнях содержания примесей в субстанции КОН-1 (0,1, 0,5 и 0,75%). Границы открываемости МЭАПВК и ББА не выходят за пределы 75–125%, рекомендованные при количественном определении примесей с нормой содержания от 0,1 до 1%.

Ключевые слова: производные 3-гидрокси-3-пирролин-2-она, метиловый эфир ацетилпировиноградной кислоты, 4-бромбензальдегид, валидация, обращённо-фазная ВЭЖХ.

## DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODS OF DETERMINATION OF IMPURITIES IN THE SUBSTANCE OF THE BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUND KON-1

Karpenko J.N.<sup>1</sup>, Klyasheva O.N.<sup>1</sup>, Yarygina T.I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>«The Perm state pharmaceutical academy» Ministry of Health of Russian Federation, Perm, Russia (614990, Perm, Polevay st., 2), e-mail: [perm@pfa.ru](mailto:perm@pfa.ru)

New biologically active substance from group of derivatives of 3-hydroxy-3-pyrrolin-2-on KON-1 which exceeded on antiamnestic action of pyracetam are synthesized. The impurity (the initial product of synthesis) – methilic aether acetylpyrovic acid (MAAPVA) and 4-brombenzaldehyd (BBA) was determine by reserve phase HPLC. The analysis performed on C18 column (25cm×4,6mm, sorbent Discovery® C18, 5 µm particle size). Mobile phase: phosphate buffer (pH7) – acetonitrile; elution mode – gradient; the wave length of detection – 310 nm (for MAAPVA), 260 nm (for BBA). Linearity of elaborated methodic determined on the five levels of concentration in the range MAAPVA and BBA of 0,05-1.0% from the content of active substance – KON-1. The limit of detection and limit of quantitation of MAAPVA were 0,8 µg/ml and 1.5 µg/ml and for BBA were 0,3 µg/ml and 0.5 µg/ml, respectively. Evaluation repeatability of methodic conducted in the range concentration MAAPVA and BBA of 2-15 µg/ml. The relative standard deviation (RSD) was no more than 10%. The determination of accuracy conducted on the three levels content of impurities in substance KON-1 (0,1, 0,5 and 0,75%). Limit of recovery of MAAPVA and BBA don't get out from 75 – 125% which recommended to quantitation the impurity with standard of content from 0,1 to 1%.

Key words: 3-hydroxy-3-pyrrolin-2-on, methilic aether acetylpyrovic acid, 4-brombenzaldehyd, validation, reserve phase HPLC.

### Введение

В результате поиска биологически активных соединений в ряду производных 5-арил-4-ацил-3-гидрокси-1-гидроксиалкил-3-пирролин-2-она выявлено соединение КОН-1, превосходящее по антиамнестическому действию пираретам [1]. В связи с рекомендацией к

проведению доклинических испытаний нами проводятся исследования по разработке методов контроля качества и стандартизации субстанции и лекарственных форм этого соединения [3-5].

В основе синтеза КОН-1 лежит трёхкомпонентная реакция [1]. Возможными специфическими примесями (исходные вещества в синтезе) в субстанции этого соединения являются метиловый эфир ацетилпировиноградной кислоты (МЭАПВК), 4-бромбензальдегид (ББА) и 3-аминопропанол [5].

**Целью** настоящего исследования явилась разработка и валидация методики определения посторонних примесей МЭАПВК и ББА в субстанции КОН-1 методом обращённо-фазной ВЭЖХ.

#### **Материалы и методы исследования**

В исследованиях использовался высокоэффективный жидкостный хроматограф Shimadzu LC Prominence (Япония), оснащённый колонкой из нержавеющей стали (25 см ×4,6 мм, сорбент Discovery® C18 с размером частиц 5 мкм) и диодноматричным детектором.

Для приготовления подвижных фаз использовали воду бидистиллированную, фосфатный буфер (рН 7), ацетонитрил для хроматографии, метанол [2].

В работе использовали пять серий субстанции КОН-1, синтезированные на кафедре фармацевтической химии ФОО ПГФА в 2008-2012 гг.

#### **Результаты исследований и их обсуждение**

В результате проведенных исследований [6] для определения посторонних примесей в субстанции КОН-1 были выбраны следующие хроматографические условия:

- подвижная фаза: фосфатный буфер (рН 7) – ацетонитрил;
- режим элюирования – градиентный (исходная доля ацетонитрила в элюенте – 20% в течение 10 минут, с 10 по 20 мин. возрастание доли ацетонитрила до 80%);
- температура термостата колонки – 40 °С;
- скорость потока подвижной фазы – 1,5 мл/мин.
- объем вводимой пробы – 20 мкл;
- длина волны детектирования – 310 нм (для МЭАПВК), 260 нм (для ББА).

*Методика определения примесей.* 0,050 г субстанции КОН-1 помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 15 мл метанола, доводят объем колбы метанолом до метки и перемешивают. Концентрация субстанции КОН -1 в анализируемом растворе составляет 0,002 г/мл (2000 мкг/мл). Раствор хроматографируют не менее 3 раз.

Валидацию аналитической методики проводили по параметрам: специфичность, линейность, правильность, повторяемость (сходимость), предел обнаружения и предел количественного определения.

Для подтверждения **специфичности** методики проанализированы модельная смесь КОН-1 (2 мг/мл), МЭАПВК и БАА (10 мкг/мл) в метаноле и растворитель образца (метанол). Идентификацию веществ на хроматограмме осуществляли путем сопоставления времён удерживания аналитов и стандартных образцов. Анализ «холостой» хроматограммы (растворителя образца) показал отсутствие мешающих посторонних пиков.

При анализе модельной смеси оценены параметры, характеризующие пригодность хроматографической системы: коэффициент разделения ( $R_s$ ), эффективность колонки, коэффициент асимметрии пиков, критерий воспроизводимости результатов измерений (воспроизводимости инъекций) (табл. 1). Полученные данные свидетельствуют о приемлемом разрешении и воспроизводимости хроматографической системы.

Таблица 1 - Параметры пригодности хроматографической системы

Вещество	Время удерживания, мин*	Коэффициент разделения пиков $R_s$	Коэффициент асимметрии	Эффективность колонки (N)	RSD % площади пика*
МЭАПВК	2,40 ± 0,02		1,21	4020 тт	0,55
КОН-1	5,45 ± 0,02	6			
БАА	18,78 ± 0,03	17	1,35	8900 тт	0,32
		<i>Критерий приемлемости:</i> не менее 2	<i>Критерий приемлемости:</i> 0,8 – 1,5	<i>Критерий приемлемости:</i> более 2000	<i>Критерий приемлемости:</i> не более 2

\*- расчет проводился по 5 хроматограммам раствора

**Линейность** методики определяли на пяти или шести уровнях концентраций: для МЭАПВК - 0,1; 0,25; 0,35; 0,5; 1% от содержания в основном веществе – субстанции КОН-1; для БАА – 0,05; 0,1; 0,25; 0,35; 0,5; 1% от содержания в основном веществе. Для этого в мерные колбы вместимостью 25 мл помещали раствор МЭАПВК или БАА в метаноле с точной концентрацией около 50 мкг/мл (0,5, 1,0, 2,5, 3,5, 5,0 и 10,0 мл) и доводили объем колб метанолом до метки.

Каждый из полученных растворов хроматографировали в разработанных условиях не менее 3 раз. Рассчитывали среднее значение площадей пиков и строили кривую зависимости площади пика от концентрации вещества в растворе (табл. 2, рис. 1, 2).

Предел обнаружения МЭАПВК – 0,8 мкг/мл (0,04% от содержания в субстанции КОН-1); предел количественного определения – 1,5 мкг/мл (0,075% от содержания в субстанции КОН-1).

Предел обнаружения БАА – 0,3 мкг/мл (0,015% от содержания в субстанции КОН-1); предел количественного определения – 0,5 мкг/мл (0,025% от содержания в субстанции КОН-1).

Таблица 2 - Данные для построения калибровочных графиков МЭАПВК и БА

Концентрация МЭАПВК, мкг/мл	Площадь хроматографического пика	Концентрация БА, мкг/мл	Площадь хроматографического пика
-	-	1,03	81737
2,09	39540	2,06	160962
5,22	106792	5,16	438139
7,31	159601	7,22	565983
10,44	220885	10,32	854263
20,88	468876	20,64	1620573

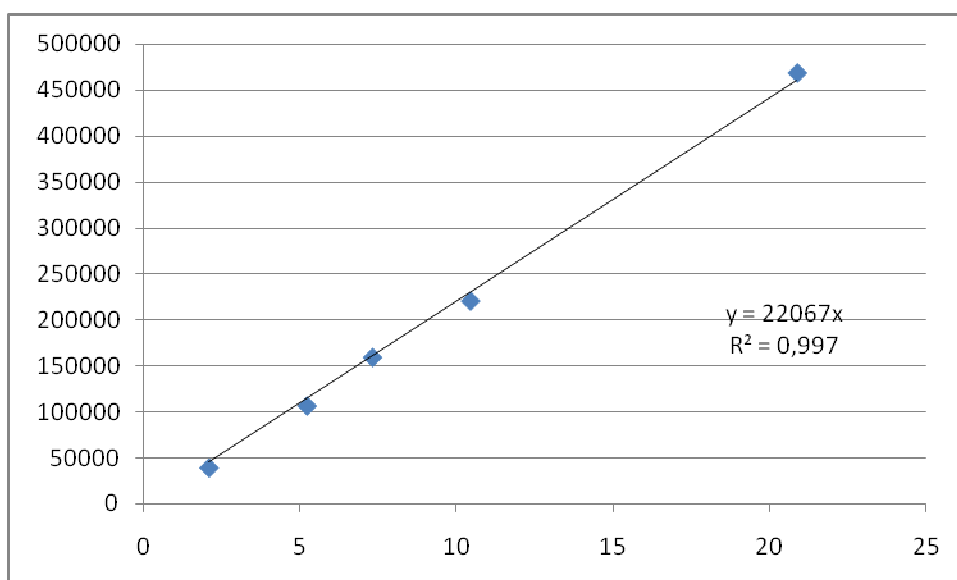


Рис. 1. Калибровочный график количественного определения МЭАПВК

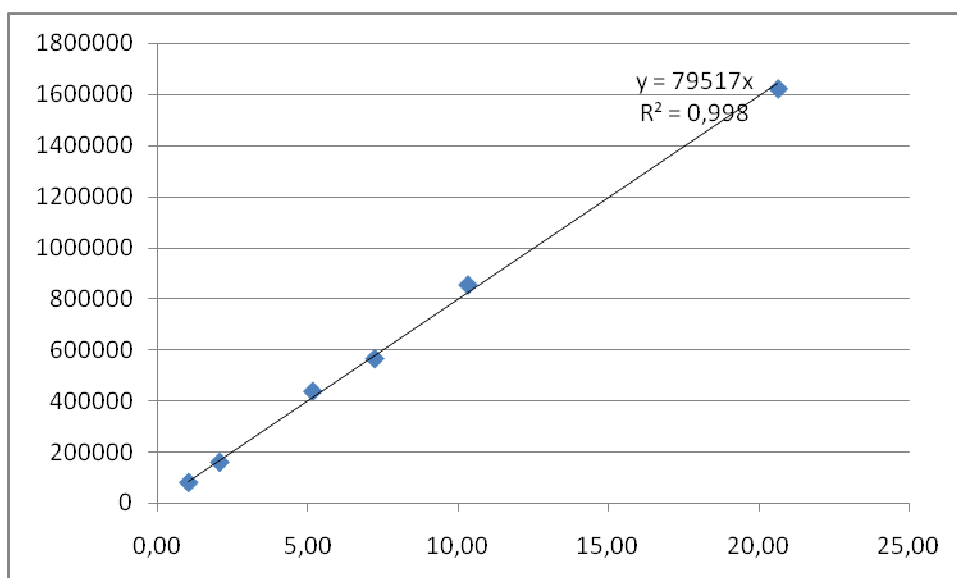


Рис. 2. Калибровочный график количественного определения БА

Оценку **внутрилабораторной повторяемости** разработанной методики проводили на модельных растворах. Для этого 0,050 г субстанции КОН-1 помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляли растворы МЭАПВК и БА в метаноле с концентрацией 50 мкг/мл до получения концентраций, соответствующих 0,1; 0,25; 0,5 и 0,75% от содержания основного вещества, и доводили объем колб метанолом до метки. Каждый из растворов хроматографировался не менее 3 раз (табл. 3 и 4).

Относительное стандартное отклонение не превышает 10,0%, что свидетельствует об удовлетворительной сходимости результатов на всех уровнях рассматриваемых концентраций для обоих веществ.

Таблица 3 – Оценка внутрилабораторной повторяемости методики определения МЭАПВК

Содержание МЭАПВК в модельной смеси, мкг/мл	Найденное содержание МЭАПВК, мкг/мл	Метрологические характеристики (P =0,95; n=6)				
		n	Хср.	SD	RSD	ΔX
2	1,66; 1,87; 1,78; 2,04; 1,63; 1,91	6	1,82	0,150	8,29	0,16
5	4,52; 5,11; 4,24; 4,72; 5,08; 4,50	6	4,70	0,334	7,12	0,36
10	10,12; 8,76; 9,78; 10,07; 8,88; 9,62	6	9,54	0,586	6,15	0,61
15	14,52; 15,06; 13,98; 14,83; 15,21; 14,56	6	14,69	0,44	2,98	0,44

Таблица 4 – Оценка внутрилабораторной повторяемости методики определения БА

Содержание БА в модельной смеси, мкг/мл	Найденное содержание БА, мкг/мл	Метрологические характеристики (P =0,95; n=6)				
		n	Хср.	SD	RSD	ΔX
2	1,58; 1,65; 1,84; 1,49; 1,88; 1,61	6	1,68	0,123	7,33	0,16
5	5,36; 4,72; 5,19; 4,92; 5,21; 5,09	6	5,08	0,223	4,51	0,24
10	9,74; 10,40; 10,18; 9,92; 9,67; 10,22	6	10,02	0,276	2,76	0,30
15	14,30; 15,27; 14,10; 14,82; 15,15; 15,38	6	14,84	0,472	3,19	0,56

При определении **правильности** методики оценивали открываемость известного количества посторонних примесей, введенных в плацебо (субстанцию КОН-1). Исследования проведены на трех уровнях содержания примесей (0,1; 0,5 и 0,75%). По 0,05 г субстанции КОН-1 помещали в мерные колбы вместимостью 25 мл, растворяли в 10 мл метанола, добавляли в каждую колбу раствор МЭАПВК и БА в метаноле с концентрацией 50 мкг/мл

(1,0; 5,0 и 7,5 мл) и доводили объем колб метанолом до метки. Результаты представлены в таблицах 5-6.

Границы открываемости МЭАПВК и БА не выходят за пределы 75–125%, рекомендованные при количественном определении примесей с нормой содержания от 0,1 до 1%.

Анализ пяти серий субстанции КОН-1 показал, что содержание в них посторонних примесей МЭАПВК и БА не превышает 0,1%.

Разработанная методика включена в проект ФС на субстанцию КОН-1.

Таблица 5 – Оценка правильности методики определения МЭАПВК

Содержание МЭАПВК в модельной смеси, мкг/мл	Открываемость (R), %	Метрологические характеристики (P =0,95; n=6)				
		n	R ср.	SD	RSD	ΔR
2	79,2; 82,5; 88,6; 77,2; 101,5; 86,2	6	89,2	8,47	9,50	9,00
10	100,1; 87,4; 94,2; 103,6; 89,1; 97,8	6	95,4	6,23	6,54	6,64
15	102,1; 98,9; 100,5; 97,3; 99,1; 97,8	6	98,8	2,61	2,65	2,78

Таблица 6 – Оценка правильности методики определения БА

Содержание БА в модельной смеси, мкг/мл	Открываемость (R), %	Метрологические характеристики (P =0,95; n=6)				
		n	R ср.	SD	RSD	ΔR
2	99,7; 105,1; 93,4; 97,1; 102,7; 90,9	6	98,15	4,36	4,44	5,70
10	102,5; 95,6; 100,8; 95,2; 92,0; 98,1	6	97,37	3,87	3,97	4,07
15	96,2; 102,8; 100,3; 92,8; 98,4; 94,3	6	97,47	3,48	3,58	3,94

### Выводы

1. Разработан способ определения примесей МЭАПВК и БА в субстанции КОН-1 методом обращенно-фазной ВЭЖХ.
2. Валидация разработанной методики по параметрам специфичность, линейность, предел обнаружения и предел количественного определения, повторяемость (сходимость), правильность показала её приемлемость для определения 0,05-0,75% примесей МЭАПВК и БА в субстанции КОН-1.

### Список литературы

1. Гейн В.Л. Синтез и фармакологическая активность 1-замещенных 5-арил-4-ацил-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов / В.Л. Гейн [и др.] // Хим.-фармац. жур. - 1998. - Т. 32, № 5. - С. 23-25.
2. Государственная Фармакопея РФ / М-во здравоохранения Рос. Федерации. – 12-е изд., репринт. – М. : Научный центр экспертиз средств медицинского применения, 2008. – Ч. 1. – 704 с. : ил.
3. Кляшева О.Н. Оценка качества субстанции нового биологически активного соединения / О.Н. Кляшева [и др.] // Фармация. - 2012. - Т. 61, № 5. - С. 8-10.
4. Кляшева О.Н. Разработка унифицированных методик количественного определения новых биологически активных соединений из группы производных 3-пирролин-2-она / О.Н. Кляшева, К.В. Ван, Т.И. Ярыгина // Сборник научных трудов и тезисов: РУДН. - М., 2011. – С. 123-124.
5. Кляшева О.Н. Использование реакции с нингидрином в количественном определении алифатических аминов / О.Н. Кляшева [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 3. - URL: <http://www.science-education.ru/109-9160> (дата обращения: 15.05.2013).
6. Кляшева О.Н. Выбор условий хроматографического разделения специфических примесей в субстанциях соединений из группы производных 3-гидрокси-3-пирролин-2-она // О.Н. Кляшева [и др.] // Актуальные проблемы науки фармац. и мед. вузов: от разработки до коммерциализации : материалы науч.-практ. конференции с международным участием, посвященной 75-летию Перм. гос. фармац. акад. - Пермь, 2011. – С. 97-101.

**Рецензенты:**

Коркодинова Любовь Михайловна, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармацевтической химии ФОО ГБОУ ВПО «ПГФА» Минздрава России, г. Пермь.  
Вихарева Елена Владимировна, доктор фармацевтических наук, доцент, заведующий кафедрой аналитической химии ГБОУ ВПО «ПГФА» Минздрава России, г. Пермь.