

УДК 543.89

<https://www.doi.org/10.34907/JPQAI.2020.49.35.001>

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСТОТЫ НОВОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ 4,4'-(ПРОПАНДИАМИДО) ДИБЕНЗОАТ НАТРИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Ю.Э. Генералова, преподаватель кафедры аналитической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России (ФГБОУ ВО СПХФУ), г. Санкт-Петербург

В.Ф. Апраксин, старший преподаватель кафедры аналитической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России (ФГБОУ ВО СПХФУ), г. Санкт-Петербург

Г.М. Алексеева, канд. хим. наук, доцент кафедры аналитической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России (ФГБОУ ВО СПХФУ), г. Санкт-Петербург

Разработаны и валидированы методики определения родственных примесей и остаточных органических растворителей для определения чистоты ранее незарегистрированной фармацевтической субстанции 4,4'-(пропандиамидо) дибензоат натрия с использованием методов высокоэффективной жидкостной хроматографии и газовой хроматографии.

Ключевые слова: фармацевтическая субстанция, чистота, родственные примеси, остаточные органические растворители, высокоэффективная жидкостная хроматография, газовая хроматография

При стандартизации новой фармацевтической субстанции (ФС) одной из важнейших характеристик является ее чистота, определяемая такими показателями качества, как «Температура плавления», «рН», «Потеря в массе при высушивании», «Сульфатная зола», «Тяжелые металлы» и «Микробиологическая чистота», которые являются стандартными. Процедуры и критерии оценки

качества субстанции определены общими фармакопейными статьями (ОФС) Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ). Определение примесей по показателям «Родственные примеси» и «Остаточные органические растворители» (ООР) требует разработки методик анализа, пригодных для оценки качества субстанции, с учетом схемы синтеза (использованных исходных соединений и растворителей).

Целью настоящего исследования явилась разработка и валидация методик определения родственных примесей и ООР в новой ФС «4,4'-(пропандиамидо) дибензоат натрия» с использованием хроматографических методов анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Субстанция 4,4'-(пропандиамидо) дибензоат натрия (условное название – малабен), синтезирована на кафедре органической химии СПХФУ, является производным малонового эфира (МЭ) и п-аминобензойной

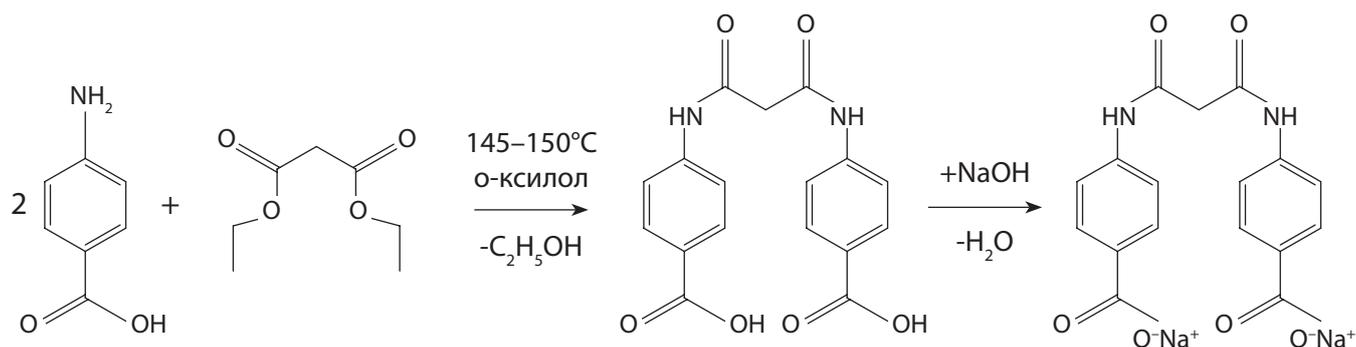


РИС. 1. Схема синтеза 4,4'-(пропандиамидо) дибензоата натрия

кислоты (ПАБК) и обладает антиатеросклеротическим, антиалкогольным и антиоксидантным действием [1,2]. Исследования проводили с использованием микроколоночного высокоэффективного жидкостного хроматографа «Милюхром А-02» с УФ-детектором и колонкой, заполненной сорбентом ProntoSIL 120-5-C18 AQ, геометрией 75×2 мм (производитель – «Эконова», Россия, Новосибирск), а также газового хроматографа «Кристалл 5000» с пламенно-ионизационным детектором и колонкой с полидиметилсилоксановой неподвижной жидкой фазой Solgel MS-1 (производитель – СКБ «Хроматэк», Россия, Йошкар-Ола).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез малабена проводят по схеме, представленной на рис. 1, с последующей перекристаллизацией из спирта. Малабен представляет собой динатриевую соль, легко растворим в воде; практически нерастворим в ацетонитриле, этаноле, этилацетате, хлороформе. Протонированная форма 4,4'-(пропандиамидо) дибензоата натрия нерастворима в воде, спирте, ацетонитриле, этилацетате, растворима в ДМСО/ДМФА.

В качестве родственных примесей, исходя из схемы синтеза, в целевом продукте возможно наличие исходных соединений ПАБК и МЭ, а также побочного продукта

4-((3-оксо-3-этоксипропаноил) амино) бензойной кислоты, который представляет собой монозамещенный амид МЭ (условное название – этмабен) (рис. 2).

При разработке методик анализа примесей руководствовались общими нормами к предельным содержаниям идентифицированных примесей, предъявляемыми ГФ РФ, которые не должны превышать 0,1%.

ООР о-ксилол относится к II классу токсичности, и его содержание в субстанции допустимо в пределах 0,217%. Потеря в массе при высушивании (ПМПВ) субстанции составляла менее 0,5%, поэтому этиловый спирт, используемый на последней стадии синтеза, не контролировали [3].

Определение нелетучих родственных примесей проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с УФ-детектированием.

Выбор состава подвижной фазы был обусловлен химическими свойствами определя-

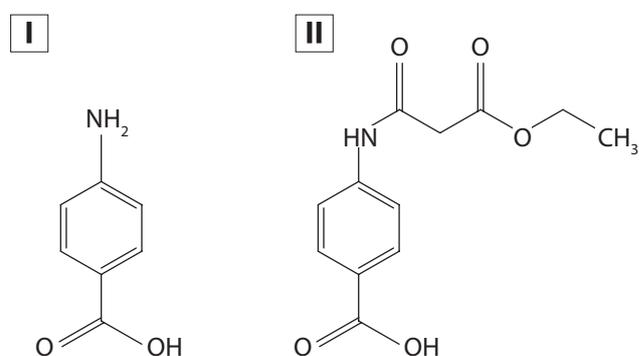


РИС. 2. Структурные формулы родственных примесей (I – ПАБК, II – этмабен)

Таблица 1

УСЛОВИЯ АНАЛИЗА

Колонка	ProntoSIL 120-5-C18 AQ 75 мм × 2 мм × 5 мкм, допускается использование альтернативной колонки, удовлетворяющей требованиям пригодности хроматографической системы
Подвижная фаза	Раствор фосфорной кислоты (рН=2,8) – метанол Линейный градиент от 30 до 80% метанола. Время записи хроматограммы 20 минут.
Скорость потока	0,1 мл/мин
Температура колонки	40°C
Длина волны детектора	270 нм
Объем пробы	2 мкл

емых примесей и ФС. Исследуемые объекты анализа являются полярными соединениями, поэтому для увеличения их сродства к обращенно-фазовому сорбенту и, соответственно, увеличения эффективности и селективности хроматографического разделения рН подвижной фазы должен иметь низкое значение. Значение рКа для ПАБК составляет 4,85 [4], для малабена – 5,6 и 7,2 [5]. Исходя из этих значений, было подобрано оптимальное значение рН, равное 2,8. Следует отметить, что более низкое значение рН приводит к выпадению осадка протонированной формы малабена.

При выбранном значении рН все анализируемые соединения имеют максимум поглощения области 270 нм. Выбранные условия хроматографического анализа [6] приведены в табл. 1.

Испытуемый раствор готовили в концентрации 1 мг/мл. Стандартные растворы примесей готовили последовательным разбавлением исходных растворов до концентрации 1 мкг/мл. В качестве растворителя использовали 40%-ный раствор метанола в воде. Для оценки разрешения пиков был приготовлен модельный раствор (испытуемый раствор

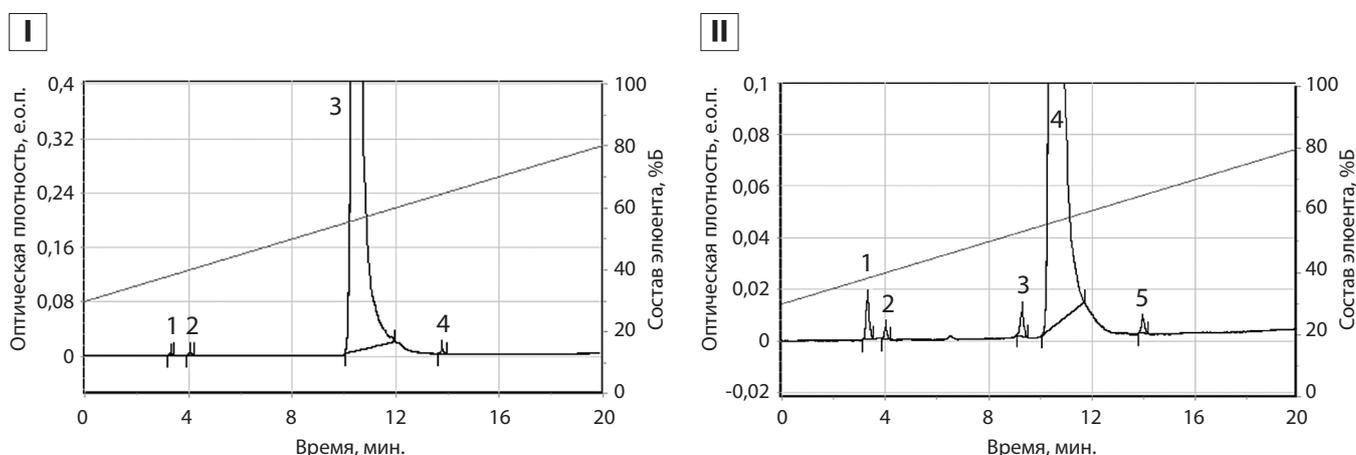


РИС. 3. Типичные хроматограммы ВЭЖХ (I – испытуемый раствор: пик 1 – ПАБК, пик 2 – е.н.п., пик 3 – малабен; II – испытуемый раствор с добавкой специфических примесей: пик 1 – ПАБК, 2 – е.н.п., 3 – этмабен, 4 – малабен, 5 – е.н.п.)

с добавками идентифицированных примесей). Типичные хроматограммы испытуемого и модельного растворов приведены на рис. 3.

Результаты анализа испытуемых растворов и растворов с добавками известных примесей показали наличие примеси ПАБК (содержанием менее 0,1%) и пиков единичных неидентифицированных примесей, а также отсутствие примеси этмабена.

Определение летучей родственной примеси и остаточных органических растворителей проводили методом газовой хроматографии с использованием пламенно-ионизационного детектора. Для определения содержания МЭ в качестве неподвижной фазы (НФ) целесообразно использовать хроматографическую

колонку с умеренно-полярной НФ (к примеру, цианопропилфенилметилполисилоксан), например, DB-624, ZB-624, DB-1701, DB-210. Ввиду того, что число аналитов в образце незначительно, возможно использование полифенилметилсилоксановой НФ, например, HP-5, ZB-5, DB-5, SE-54, OV-5, ПФМС, или диметилполисилоксановой, например, HP-1, ZB-1, DB-1, SE-30, OV-1, ПМС [7]. Испытания ФС на содержание летучих родственных примесей были проведены в следующих хроматографических условиях (см. табл. 2).

На рис. 4 приведены типичные хроматограммы определения примеси малонового эфира в выбранных хроматографических условиях.

Таблица 2

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ НА СОДЕРЖАНИЕ ЛЕТУЧИХ РОДСТВЕННЫХ ПРИМЕСЕЙ

Колонка	Хроматографическая капиллярная колонка с диметилполисилоксановой НЖФ Solgel MS-1, толщина пленки НЖФ 0,25 микрометра, внутренний диаметр колонки 0,25 миллиметра, длина колонки 30 метров, или аналогичная, удовлетворяющая критериям пригодности хроматографической системы
Газ-носитель	Гелий, давление на входе в колонку 75 кПа, деление потока 1/50
Кондиционирование колонки	При температуре термостата колонок 250°C в течение 30 минут
Температура термостата колонки	Режим программирования температур: начальная температура термостата колонок 100°C в течение 4 минут, затем увеличение со скоростью 5°C/мин до 155°C, после чего увеличение температуры термостата колонки до 250°C для последующего кондиционирования (продувки)
Температура инжектора	240°C
Температура детектора	250°C
Объем пробы	2 мкл
Детектор	Пламенно-ионизационный. Условия газового питания в соответствии с его эксплуатационной документацией либо: расход воздуха 300 мл/мин, расход водорода 30 мл/мин, поддув 10 мл/мин
Время хроматографирования	Ориентировочное время хроматографирования 15 минут или на 50% больше времени удерживания малонового эфира

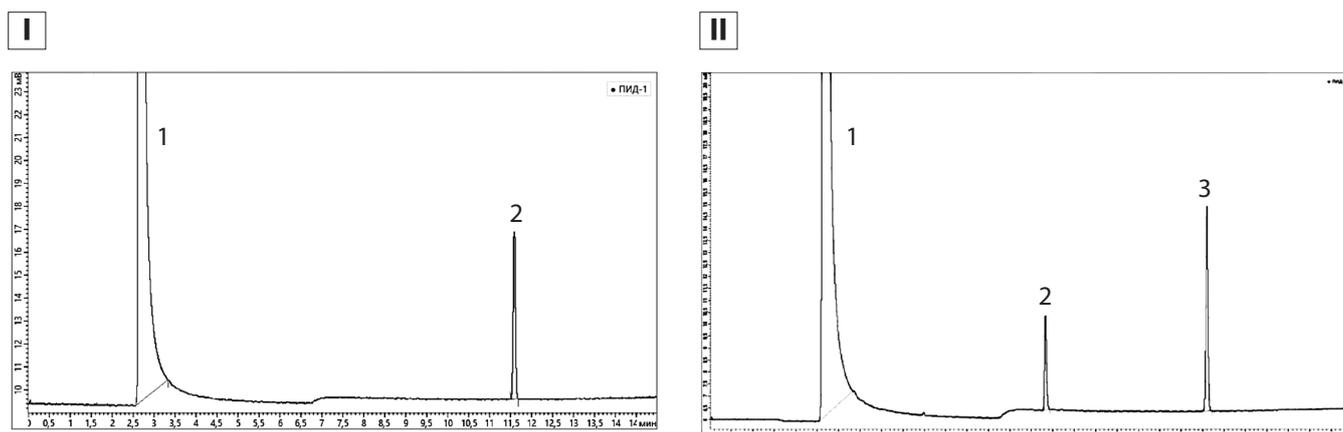


РИС. 4. Типичные хроматограммы ГХ (I – испытуемый раствор: пик 1 – этиловый спирт, пик 2 – нафталин; II – испытуемый раствор с добавкой примеси малонового эфира: пик 1 – этиловый спирт, пик 2 – малоновый эфир, пик 3 – нафталин)

Определение остаточного содержания о-ксилола проводили в тех же хроматографических условиях (рис. 5).

Для повышения воспроизводимости результатов анализ проводили с использованием внутреннего стандарта (нафталин). Для всех

приведенных выше методик анализа провели валидационную оценку по следующим показателям: специфичность, предел количественного определения, линейность, прецизионность, правильность, аналитическая область, устойчивость, пригодность хроматографической

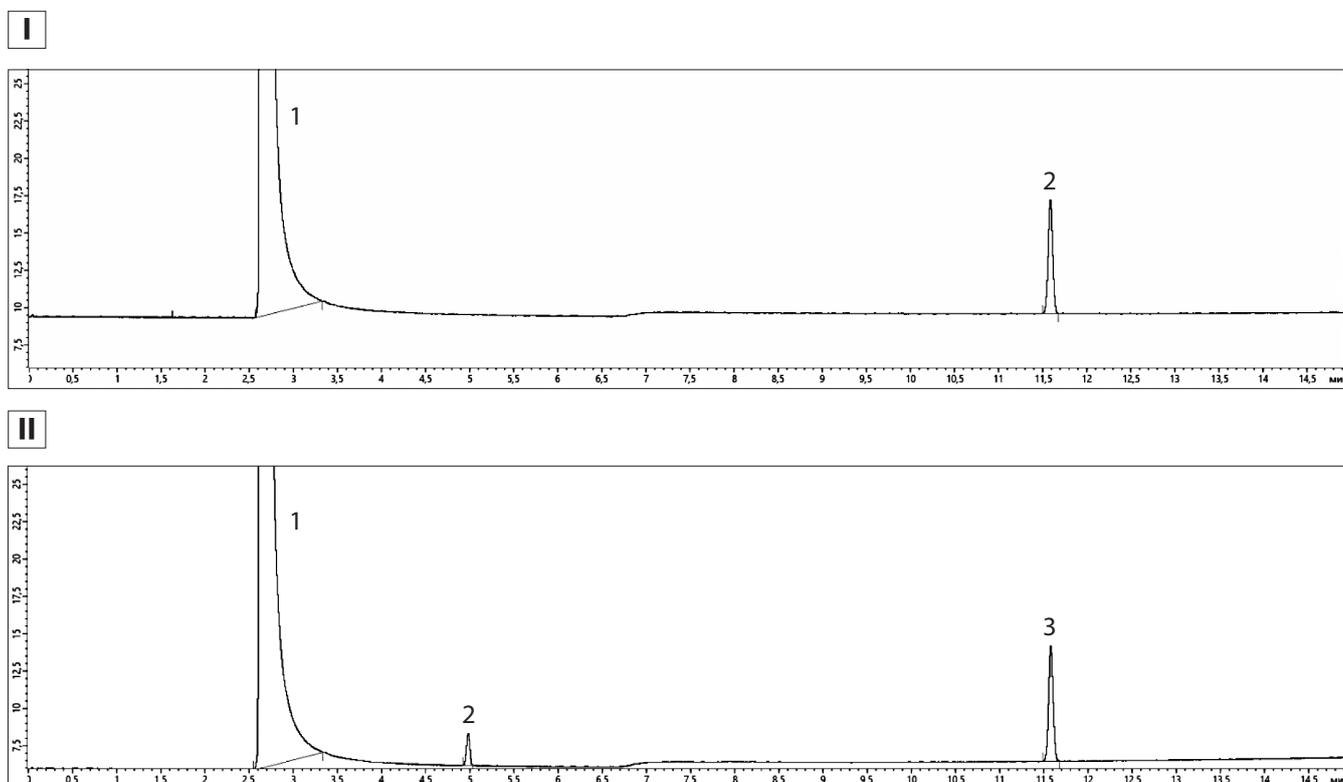


РИС. 5. Типичные хроматограммы ГХ (I – испытуемый раствор: пик 1 – этанол, пик 2 – нафталин; II – испытуемый раствор с добавкой о-ксилола: пик 1 – этиловый спирт, пик 2 – о-ксилол, пик 3 – нафталин)

РЕЗУЛЬТАТЫ ВАЛИДАЦИИ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК

Валидационный показатель	Результат проверки валидационного показателя аналитической методики		
	Родственные примеси методом ВЭЖХ	Родственные примеси методом ГХ	Остаточные органические растворители
Специфичность	<ul style="list-style-type: none"> растворитель не имеет системных пиков и не мешает определению родственных примесей; разрешение между пиками составляет более 2,5 	На хроматограммах присутствуют только те пики, которые соответствуют требованиям специфичности хроматографической системы, и отсутствуют коэлюирующиеся системные пики	На хроматограммах присутствуют только те пики, которые соответствуют требованиям специфичности хроматографической системы, и отсутствуют коэлюирующиеся системные пики
Линейность	<ul style="list-style-type: none"> $r = 0,9995$; отрезок, отсекаемый на оси Y, – 4,0% 	<ul style="list-style-type: none"> $r = 0,9994$; абсолютное значение свободного члена в уравнении линейной регрессии (0,0002) не превышает его доверительный интервал (0,00745) 	<ul style="list-style-type: none"> $r = 0,9970$; абсолютное значение свободного члена в уравнении линейной регрессии (0,0024) не превышает его доверительный интервал (0,045)
Предел количественного определения	При концентрации 0,1 мкг/мл: <ul style="list-style-type: none"> соотношение сигнал/шум 14,8; RSD = 3,4% 	При концентрации 3 мкг/мл: <ul style="list-style-type: none"> соотношение сигнал/шум 30 	При концентрации 1,6 мкг/мл: <ul style="list-style-type: none"> соотношение сигнал/шум 30
Сходимость	RSD = 1,3%	RSD = 3%	RSD = 4%
Внутрилабораторная прецизионность	<ul style="list-style-type: none"> $F_{\text{экс.}} = 2,14 < F_{\text{табл}} = 5,05$ $t_{\text{экс.}} = 2,02 < t_{\text{табл}} = 2,20$ 	<ul style="list-style-type: none"> $F_{\text{экс.}} = 1,42 < F_{\text{табл}} = 5,05$ $t_{\text{экс.}} = 2,05 < t_{\text{табл}} = 2,57$ 	<ul style="list-style-type: none"> $F_{\text{экс.}} = 1,91 < F_{\text{табл}} = 4,28$ $t_{\text{экс.}} = 0,86 < t_{\text{табл}} = 2,45$
Правильность	Абсолютное значение свободного члена в уравнении линейной регрессии (0,0070) не превышает его доверительный интервал (0,0075)	Отличие полученных и заданных содержаний МЭ в растворе статистически незначимо при доверительной вероятности 95%	Отличие полученных и заданных содержаний МЭ в растворе статистически незначимо при доверительной вероятности 95%
Аналитическая область	От 0,1 до 1,2 мкг/мл (от ПКО до 120% содержания примеси)	От 3 до 80 мкг/мл (от ПКО до 150% содержания примеси)	От 1,6 до 40 мкг/мл (от ПКО до 150% содержания примеси)

Таблица 4

**АНАЛИЗ ОБРАЗЦОВ 4,4'-(ПРОПАНДИАМИДО) ДИБЕНЗОАТА НАТРИЯ
ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ ЧИСТОТЫ**

Показатель качества	Норма	Результаты испытаний		
		с. 010317	с. 020417	с. 030517
Родственные примеси, %	Примесь ПАБК – не более 0,1; е.н.п* – не более 0,1; сумма примесей – не более 0,5	Не обнаружена Менее 0,1 Менее 0,5	Менее 0,1 Менее 0,1 Менее 0,5	Менее 0,1 Менее 0,1 Менее 0,5
	Малоновый эфир – не более 0,1	Не обнаружен	Не обнаружен	Не обнаружен
ПМПВ, %	Не более 0,5	0,31	0,35	0,4
ООР, %	о-ксилол – не более 0,217	Не обнаружен	Не обнаружен	Не обнаружен

* е.н.п. – единичная неидентифицированная примесь

системы. Результаты валидации, представленные в табл. 3, показывают, что аналитические методики пригодны для решения поставленных задач.

Определение чистоты субстанции 4,4'-(пропандиамидо) дибензоат натрия проводили на трех сериях образца [8]. Результаты анализа представлены в табл. 4.

ВЫВОДЫ

- В ходе проведенных экспериментов:
- разработаны методики хроматографического анализа (ВЭЖХ и ГХ) родственных примесей и ООР в субстанции 4,4'-(пропандиамидо) дибензоат натрия, проявляющей фармакологическую активность;
 - проведена валидация разработанных методик;
 - результаты анализа трех серий определения чистоты субстанции 4,4'-(пропандиамидо) дибензоат натрия по показателям «Родственные примеси» и «Остаточные

органические растворители» соответствуют заявленным требованиям.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Патент РФ №2624729, 06.07.2017. Способ получения 4,4'-(пропандиамидо) дибензоата натрия // Патент России №2624729. 2017. Бюлл. №19 / Юсковец В.Н., Чернов Н.М., Яковлев И.П., Наркевич И.А.
2. Бажанова Е.Д., Оковитый С.В., Белых М.А. Влияние 4,4'-(пропандиамидо) дибензоата натрия и метформина на динамику апоптоза и пролиферации гепатоцитов у мышей с сахарным диабетом и ожирением // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – Том 81, №5. – С. 17–20.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. Том 1 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>
4. U.S. National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information [сайт].

URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/978#section=Dissociation-Constants>

5. Алексеева Г.М., Апраксин В.Ф., Генералова Ю.Э. Изучение кислотно-основных свойств, разработка и валидация методики количественного определения оригинальной фармацевтической субстанции // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2019. – Том 8, №1. – С. 66–71.
6. Генералова Ю.Э., Алексеева Г.М. Оптимизация условий хроматографического определения примесей в фармацевтической субстанции 4,4'-(пропандиамидо) дибензоат натрия // Сборник материалов международной конференции «Современные достижения фармацевтической науки и практики», – Витебск. – 2019. – С. 198–201.
7. NIST Chemistry WebBook, SRD 69 [сайт]. URL: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C105533&Units=SI&Mask=3069>
8. Миронов А.Н. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том 2. – М.: Гриф и К. 2013. – 280 с.

DETERMINATION OF THE PURITY OF THE NEW PHARMACEUTICAL SUBSTANCE 4,4'-(PROPANDIAMIDO)DIBENZOATE SODIUM BY CHROMATOGRAPHIC METHODS

Y.E. Generalova, V.F. Apraksin, G.M. Alekseeva

Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, Russia

For determination purity of novel active pharmaceutical ingredient in the research, procedures were developed, validated and tested for the determination of related impurities (4-aminobenzoic acid, 4-((3-oxo-3-ethoxypropanoil)amino)benzoic acid, 4-(carboxyacetyl)amino)benzoic acid and malonic ester) and residual organic solvents (o-xylene) in the new pharmaceutical substance 4,4'-(propanediamido) dibenzoate sodium using high performance liquid chromatography and gas chromatography.

Keywords: active pharmaceutical ingredient, purity, related impurities, residual organic solvents, high performance liquid chromatography, gas chromatography