

УДК 54.062/3.544.5.068

<https://www.doi.org/10.34907/JPQAI.2024.45.12.004>

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ N-[2-[4-ОКСО-3(4H)-ХИНАЗОЛИНИЛ]ПРОПИОНИЛ]-ГУАНИДИНА И ЕГО РОДСТВЕННОЙ ПРИМЕСИ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

**Д.Н. Луценко**, техник по ТСО кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (г. Пятигорск, Россия), [Lucenkodasha95@mail.ru](mailto:Lucenkodasha95@mail.ru)

**А.С. Чиряпкин**, преподаватель кафедры фармацевтической химии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (г. Пятигорск, Россия), [alexeu.chiriapkin@yandex.ru](mailto:alexeu.chiriapkin@yandex.ru)

**Е.В. Компанцева**, профессор кафедры фармацевтической химии, доктор фармацевтических наук, профессор, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет», [dskompanceva@mail.ru](mailto:dskompanceva@mail.ru)

**Е.А. Масловская**, доцент кафедры фармацевтической химии, кандидат фармацевтических наук, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет», [Maslovskaya.Ek@yandex.ru](mailto:Maslovskaya.Ek@yandex.ru)

**А.Ю. Айрапетова**, доцент кафедры фармацевтической химии, кандидат фармацевтических наук, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет», [asyargfa@mail.ru](mailto:asyargfa@mail.ru)

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии проведен количественный анализ нового синтезированного соединения N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидин и его технологической примеси – незамещенного хиназолин-4(3H)-она. Обоснован выбор оптимальных условий хроматографического исследования, подтверждена хроматографическая пригодность выбранных условий. Разработанные методики валидированы – доказано, что они не содержат систематической ошибки. Нормировано содержание примеси не более 0,1%.

**Ключевые слова:** N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидин, родственная примесь, количественный анализ, высокоэффективная жидкостная хроматография, валидация

Академиком В.И. Петровым с соавторами в 2017 году синтезировано биологически активное соединение (БАС) N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидин (VMA-13-15) [1]. Доклиническими исследованиями было доказано, что полученное БАС проявляет кардиопротекторную активность, по интенсивности не уступающую зарубежным аналогам [1,2].

Основным критерием качества лекарственных средств (требования ГФ РФ XIV) является критерий «Родственные примеси» [3].

В качестве технологической примеси в процессе предварительных исследований методом капиллярного электрофореза был обнаружен исходный продукт синтеза – незамещенный хиназолин-4(3H)-он (НХ-4(3H)-он) из-за возможной неполноты протекания реак-

ции. Это вещество относится к идентифицированным примесям, так как известно его химическое строение [3].

В связи с этим для определения N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина (VMA-13-15) и его родственной примеси (НХ-4(3H)-он) был использован метод капиллярного электрофореза [4,5]. Известно, что для контроля качества фармацевтических субстанций в соответствии с требованиями ГФ в качестве основного метода используется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [3].

**Цель** данного исследования – разработка и валидация методик количественного определения субстанции N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина (лабораторный шифр VMA-13-15) и ее родственной примеси – НХ-4(3H)-она.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов были взяты три образца (серии 2017, 2019, 2021) N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина (VMA-13-15) и исходный продукт синтеза VMA-13-15 (НХ-4(3H)-он). Условным стандартным образцом (УСО) являлся перекристаллизованный двукратно из метилового спирта полученный ранее образец VMA-13-15 (99,8%), высушенный до постоянной массы. Чистота УСО установлена методом капиллярного электрофореза и подтверждена методом ВЭЖХ. Методом кислотно-основного титрования в неводных средах определено содержание VMA-13-15 в УСО (99,85±0,20%) [6].

В качестве растворителей использовались метанол для ВЭЖХ, ацетонитрил для ВЭЖХ и вода для хроматографии.

Хроматограф «Стайер» (Аквилон, Россия) с УФ-детектором UVV-104M (Аквилон, Россия), колонка Nucleosil C18 размером 150 × 4,6 мм, заполненная октадецилсиликагелем.

Температура анализируемых образцов и колонки была 20°C, объем пробы 20 мкл, длина волны спектрофотометрического детектора 254 нм. Использовали обращенно-фазовый вариант ВЭЖХ в изократическом режиме элюирования со скоростью 1,0 мл/мин. Подвижная фаза состояла из смеси ацетонитрила и 0,5% муравьиной кислоты (20:80).

**Методика 1.** *Определение VMA-13-15.* Точную навеску вещества (около 0,05 г) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 25 мл воды и доводят тем же растворителем до метки (раствор А). Переносят 2,5 мл раствора А в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят водой до метки. С помощью микропипетки отбирают 500 мкл полученного раствора, переносят в пробирку типа Эппендорф, прибавляют 500 мкл воды, перемешивают, центрифугируют 5 минут при скорости 12 000 об/мин<sup>-1</sup>. Декантируют надосадочный раствор и проводят анализ. Аналогично готовят и проводят анализ раствора УСО. Расчет содержания VMA-13-15 (X%) рассчитывают по формуле:

$$X\% = \frac{S \cdot a_0 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot (100 - W)}, \quad (1)$$

где S и S<sub>0</sub> – площадь пика испытуемого БАС и его УСО на хроматограммах испытуемого раствора и раствора УСО соответственно; a – навеска испытуемого БАС, г; W – потеря в массе при высушивании БАС, %; a<sub>0</sub> – навеска УСО БАС, г; P – содержание БАС в УСО, %.

*Построение градуировочного графика:* точную навеску УСО VMA-13-15 (около 0,0610 г) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 25 мл воды и доводят этим же растворителем до метки (раствор А). Переносят 2,5 мл раствора А в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят водой до метки. Отбирают полученный раствор микропипеткой от 300 мкл до 700 мкл (последовательно), переносят в пробирки типа Эппендорф, прибавляют того же растворителя до 1000 мкл,

перемешивают, центрифугируют 5 минут при 12 000 об/мин<sup>-1</sup>. Декантируют полученные растворы с концентрацией 0,0183; 0,0244; 0,3100; 0,3306 и 0,0427 мг/мл соответственно и подвергают анализу.

Для определения примеси НХ-4(ЗН)-она готовят растворы:

*Раствор сравнения:* точную навеску 0,0200 г НХ-4(ЗН)-она помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 80 мл воды, взбалтывают до полного растворения и доводят водой до метки, перемешивают (раствор Б). Помещают 1 мл раствора Б в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем водой до метки и перемешивают.

*Модельный раствор:* точную навеску УСО VMA-13-15 (0,2000 г) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 80 мл воды, полностью растворяют, добавляют 1 мл раствора Б, доводят объем водой до метки, перемешивают. С полученными растворами проводят анализ, как описано в методике 1.

Содержание примеси (X%) по отношению к приготовленной модельной смеси рассчитывают по формуле:

$$X\% = \frac{S_x \cdot C_{\text{пр}} \cdot W_1 \cdot W_2 \cdot 100}{S_{\text{пр}} \cdot a_x \cdot V_a \cdot 1000}, \quad (2)$$

где  $S_x$  – площадь пика примеси в испытуемом растворе;  $S_{\text{пр}}$  – площадь пика раствора сравнения;  $C_{\text{пр}}$  – концентрация раствора сравнения, мкг/мл;  $a_x$  – навеска испытуемого образца, г;  $W_1$  – объем мерной колбы, мл;  $W_2$  – объем раствора для хроматографирования, мкл;  $V_a$  – аликвота, мкл.

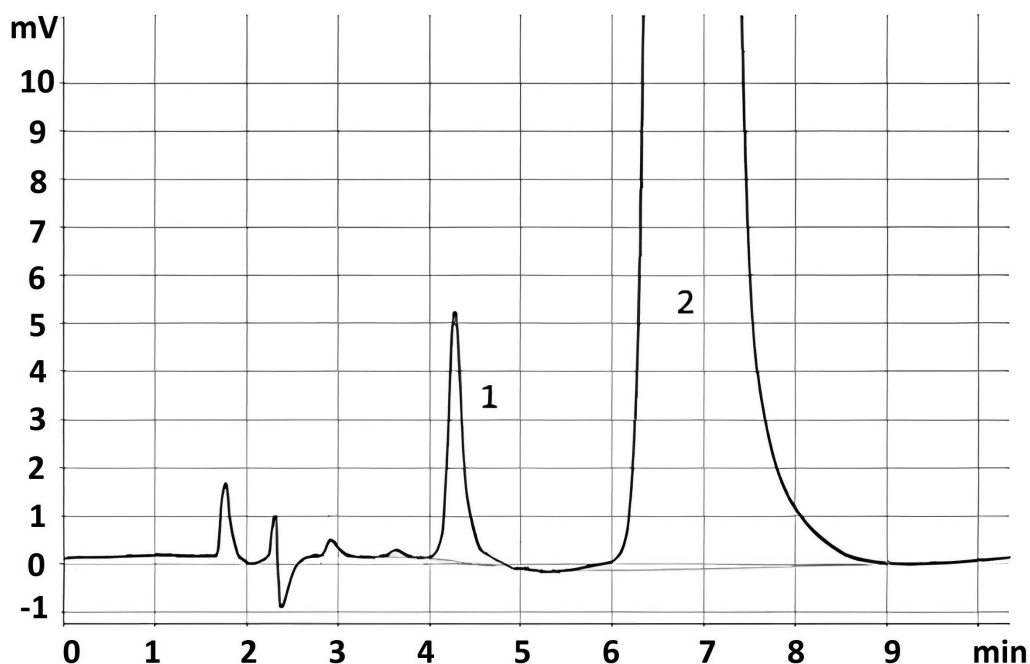
*Построение градуировочного графика НХ-4(ЗН)-она:* точные навески УСО VMA-13-15 (0,2000 г) помещают в пять мерных колб вместимостью 100 мл, растворяют в 80 мл воды, в каждую колбу прибавляют соответственно по 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 и 2,5 мл раствора Б, доводят объем водой до метки и перемешивают. Далее поступают как описано в методике 1.

**Методика 2.** Определение НХ-4(ЗН)-она в субстанции: точную навеску (около 0,1 г) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 25 мл воды и доводят водой до метки (раствор А). Параллельно готовят раствор сравнения НХ-4(ЗН)-она (см. выше). С приготовленными растворами поступают как описано в методике 1. Площадь пика примеси (время выхода 4,28 мин.) не должна превышать площади пика раствора сравнения НХ-4(ЗН)-она.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В связи с тем, что с помощью метода капиллярного электрофореза нами показана возможность присутствия в субстанции НХ-4(ЗН)-она [5], выбор условий ВЭЖХ исследования начинали с подбора состава подвижной фазы, оптимальной для обнаружения как исследуемой субстанции, так и возможных примесных соединений. Были использованы системы: (ацетонитрил: ацетатный буферный раствор / фосфатный буферный раствор; метанол: ацетатный буферный раствор / фосфатный буферный раствор; ацетонитрил / 0,5% муравьиная кислота). В результате было установлено, что оптимальной оказалась система – ацетонитрил / 0,5% муравьиная кислота. При изучении влияния различного соотношения ацетонитрила и муравьиной кислоты было установлено, что оптимальным оказалось соотношение 20:80, так как на хроматограммах полученные пики симметричны и четко отличается их время удерживания (рис. 1). Длина волны для детектирования была установлена при спектрофотометрическом анализе [7].

Таким образом, предварительными исследованиями показано, что изучаемое БАС и его возможная примесь четко разделяются между собой (рис. 1). Поэтому выбранные условия были использованы для разработки методик определения субстанции и НХ-4(ЗН)-она в субстанции VMA-13-15. Пригодность выбранных



**РИС. 1.** Хроматограмма модельной смеси стандартного образца N-[2-[4оксо-3(4н)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина (2) и незамещенного хиназолин-4(3Н)-она (1)

условий устанавливали с учетом требований ОФС.1.2.1.2.000.15 [3]. Сравнительная оценка характеристик стандартного и испытуемого образцов и примеси представлена в табл. 1

Данные табл. 1 показывают, что используемая хроматографическая система пригодна для анализа, так как разрешение ( $R_s$ ) пика примеси НХ-4(3Н)-она и УСО субстанции составило 8,25 (рекомендуемое значение  $R_s \geq 2$ ). Также укладывается в требуемый показатель ( $\geq 1500$ ) число теоретических тарелок и коэффициент асимметрии (от 0,8 до 1,5) [3].

На основании полученных данных (табл. 1) пригодной хроматографическая система будет считаться, если выполняются требования, приведенные в табл. 2. Для этой цели должен подвергаться раствор, который готовится по следующей методике: в мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 2,5 мл раствора А (см. методика 1) и 0,5 мл раствора Б (см. приготовление раствора сравнения), доводят водой объем до метки и перемешивают. Анализ проводят, как описано в методике 1.

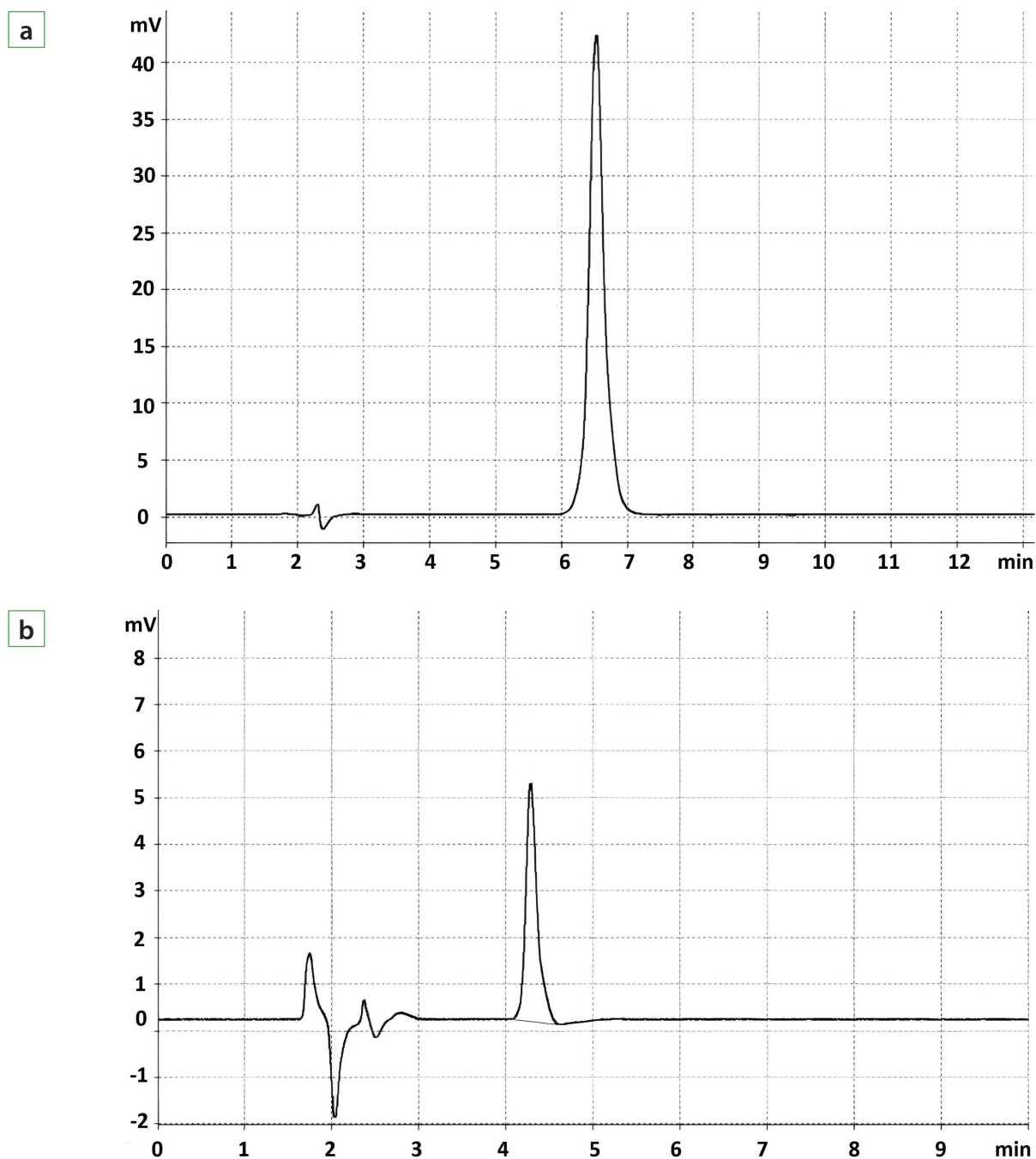
Таблица 1

**ПАРАМЕТРЫ ПРИГОДНОСТИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ**

Вещество	Время удерживания $t_r$ , мин	Разрешение ( $R_s$ )	Фактор асимметрии ( $A_s$ )	Число теоретических тарелок (N)
Хиназолин-4(3Н)-он	4,277	8,25	1,60	3096
VMA-13-15 испытуемый образец	6,687		1,29	3332
VMA-13-15 стандартный образец (СО)	6,795		1,33	3295

**ПРИГОДНОСТЬ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ**

Показатель	Значение
Эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику	Не менее 1500 теоретических тарелок
Относительное стандартное отклонение времени удерживания	Не превышает 5%
Относительное стандартное отклонение площади пика	Не превышает 5%



**РИС. 2.** Хроматограммы растворов стандартного образца N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина (a) и примеси незамещенного хиназолин-4(3H)-она (b)

Валидационная оценка для разработанных ВЭЖХ методик определения БАС и примеси проведена по требованиям ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [3].

При определении специфичности раствора стандартного образца VMA-13-15 было установлено, что, помимо пика исследуемой субстанции, присутствие посторонних пиков не наблюдали, что свидетельствует о специфичности предлагаемой методики.

Специфичность методики подтверждается, так как время удерживания пиков в модельной смеси (рис. 1) полностью совпадает со временем удерживания при хроматографировании исследуемых веществ (рис. 2).

При определении линейности готовили 5 уровней концентраций УСО и незамещенного хиназолин-4(3H)-она в N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]гуанидина. По результатам, полученным при анализе данных растворов, строили прямые зависимости площадей пика от концентрации УСО или примеси в растворе. Характеристики градуировочных графиков представлены в табл. 3.

Из анализа данных табл. 3 следует, что площади пиков растворов VMA-13-15 и НХ-4(3H)-она находятся в линейной зависимости от кон-

центрации взятой пробы. Коэффициенты корреляции (r) равны 0,9988 и 0,9965, т. е. по критерию линейность методики валидны [3].

На этапе разработки оригинальной методики достаточно определять повторяемость (сходимость) результатов, получаемых с ее использованием [3]. Для анализа использовали предлагаемые методики, испытуемый образец VMA-13-15 с потерей в массе при высушивании 0,5% и образец НХ-4(3H)-она (табл. 4).

Как следует из табл. 4, значение RSD составляет 1,20%, т. е. методика определения VMA-13-15 обладает достаточно высокой сходимостью результатов, методика определения примеси также валидна по данному показателю, так как при анализе субстанций с содержанием примесей 0,1% величина RSD не должна превышать 5% [8].

Для определения критерия «правильность» использовали значение свободного члена (a) из уравнения регрессии. Результаты методики не имеют систематической ошибки, если свободный член уравнения статистически достоверно не отличается от нуля. Полученные результаты линейной зависимости анализируемых соединений (табл. 3) показывают, что свободные члены (a) значимо

Таблица 3

**ПАРАМЕТРЫ ГРАФИКА ЛИНЕЙНОЙ ЗАВИСИМОСТИ**

Исследуемое соединение			Родственная примесь		
Концентрация, мг/мл	Площадь пика, mAU·с	Параметры линейной зависимости $Y=bx+a$	Концентрация, мг/мл	Площадь пика, mAU·с	Параметры линейной зависимости $Y=bx+a$
0,0183	507,15	$b=28366,63$	0,0005	26,88	$b=49704$
0,0244	659,71	$S_b=561,90$	0,0010	55,02	$S_b=1699,54$
0,0306	836,12	$\Delta b=1788,24$	0,0015	77,56	$\Delta b=5408,70$
0,0367	1025,73	$a=22,423$	0,0020	98,98	$a=2,964$
0,0427	1190,76	$S_a=17,834$	0,0025	129,16	$S_a=2,81$
		$\Delta a=56,75$			$\Delta a=8,96$
		$r=0,9988$			$r=0,9965$

Таблица 4

**РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБСТАНЦИИ  
И ПРИМЕСИ ПО ПОКАЗАТЕЛЮ «ПОВТОРЯЕМОСТЬ» («СХОДИМОСТЬ»)**

Субстанция ( $a_0 = 0,0500$ ; $S_0 = 699,43$ )			Примесь ( $C_{np} = 0,001$ мг/мл; $S_{np} = 55,02$ )		
Навеска, г	S, mAU·с	Найдено, %	Навеска, г	S, mAU·с	Найдено, %
0,0504	702,64	101,27	0,2005	59,54	0,1082
0,0499	699,17	100,46	0,1998	57,27	0,1040
0,0498	692,90	99,56	0,2003	54,61	0,0992
0,0496	681,45	97,91	0,1999	53,98	0,0981
0,0503	697,10	100,47	0,2007	55,75	0,1013
0,0498	689,36	99,05	0,1996	55,03	0,1001
Метрологические характеристики					
$\bar{X} = 99,78$ SD = 1,20 RSD = 1,20% $S_{\bar{x}} = 0,49$ $\epsilon = 1,26\%$			$\bar{X} = 0,1018$ SD = 0,0037 RSD = 3,63% $S_{\bar{x}} = 0,0015$ $\epsilon = 3,83\%$		

не отличаются от нуля, так как их доверительные интервалы (56,75 и 8,96 соответственно) превышают значения коэффициентов 22,42 и 2,964. Таким образом, разработанные методики не имеют значительной систематической погрешности [3].

Разработанные методики были апробированы на 3 лабораторных образцах субстанции N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]гуанидина, в результате чего получены следующие данные: серия 2017 – 100,08±0,33%; серия 2019 – 100,08±0,415%, серия 2021 – 100,01±0,27%. Примесь НХ-4(3H)-она была обнаружена только в серии 2017, содержание которой не превышало 0,1% (рис. 1).

**ВЫВОДЫ**

Обоснован выбор оптимальных условий хроматографического исследования с помощью метода ВЭЖХ для определения и исследуемой субстанции, и технологической

примеси. Подтверждена хроматографическая пригодность выбранных условий. Разработанные методики количественного определения N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]гуанидина и предполагаемой примеси незамещенного хиназолин-4(3H)-она в субстанции VMA-13-15 валидны. Нормировано содержание примеси не более 0,1%.

**БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК**

1. Пат. 2622638 РФ. Производные хиназолин-4(3H)-она, обладающие нейро- и кардиопротекторной активностью / В.И. Петров, И.Н. Тюренков, А.А. Озеров, М.С. Новиков и др. – 2016129010, заявл. 14.07.2016; опубл. 19.06.17. Бюлл. №17.
2. Глухова Е.Г. Синтез и фармакологические свойства новых карбонильных производных хиназолин-4(3H)-она: дисс. ... канд. фарм. наук. – Волгоград: ВолгГМУ, 2016. – 120.

3. Государственная фармакопея РФ: научное издание. 14-е изд. М., 2018. Т. 1. С. 276–288. [Электронный ресурс] [http://resource.ruscml.ru/feml/pharmacopia/14\\_1/HTML/index.html](http://resource.ruscml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/index.html) (дата обращения: 20.03.2021)
4. Компанцева Е.В., Луценко Д.Н., Гарсия Е.Р. Определение биологически активного соединения N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом капиллярного электрофореза // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2020. – Т. 23, №10. – С. 40–45.
5. Компанцева Е.В., Луценко Д.Н., Гарсия Е.Р., Озеров А.А., Дементьева Т.М. Разработка методики определения родственной примеси в новом биологически активном соединении кардиопротекторного действия методом капиллярного электрофореза // Человек и его здоровье. – 2023. – Т. 26, №2. – С. 73–79. DOI: 10.21626/vestnik/2023-2/09. EDN: MAKQOQ
6. Луценко Д.Н., Компанцева Е.В., Чиряпкин А.С., Ушакова Л.С. Разработка и валидация методики количественного определения нового биологически активного соединения n-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом титрования в неводной среде // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2023. – Т. 26, №9. – С. 3–11. <https://doi.org/10.29296/25877313-2023-09--00>
7. Компанцева Е.В., Луценко Д.Н., Глушко А.А. Разработка и валидация методики количественного определения биологически активного соединения n-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина // Аспирантский вестник Поволжья. – 2019. – №5–6. – С. 122–127.
8. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / Под ред. Н.В. Юргеля [и др.]. – М.: Фармацевтическая промышленность, 2007. – 48 с.

## DETERMINATION OF N-[2-[4-OXO-3(4H)-QUINAZOLINYL]PROPIONYL]-GUANIDINE AND ITS RELATED IMPURITIES BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

**D.N. Lutsenko, E.V. Kompantseva, A.S. Chiryapkin, E.A. Maslovskaya, A.Yu. Ayrapetova**

*Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of the Volgograd State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Pyatigorsk, Russia*

*High-performance liquid chromatography is used to quantify the new biologically active compound N-[2-[4-oxo-3(4H)-quinazoliny]propionyl]-guanidine and its technological impurity – unsubstituted quinazolin-4(3H)-one. The choice of optimal conditions for chromatographic research is justified, and the chromatographic suitability of the selected conditions is confirmed. The developed methods are validated – it is proven that they do not contain systematic errors. The impurity content is standardized not to exceed 0.1%.*

**Keywords:** N-[2-[4-oxo-3(4H)-quinazoliny]propionyl]-guanidine, related impurity, quantitative analysis, high performance liquid chromatography, validation