

УДК 615.225.2.015.21:004.94

## ПРОГНОЗИРОВАНИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСЕЙ И ПРОДУКТОВ ДЕСТРУКЦИИ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ КОМПОЗИЦИИ ГИПОТЕНЗИВНОГО ДЕЙСТВИЯ

© 2013 Компанцева Е.В., Бабьяк А.В., Мудрецова Ю.В., Глушко А.А.  
annav.babyak@gmail.com

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России,  
г. Пятигорск

*В работе представлены результаты определения посторонних примесей верапамила гидрохлорида и лизиноприла дигидрата с использованием методов компьютерного моделирования и высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС). Прогнозирование и расчет термодинамических характеристик веществ проведены с помощью метода RM1 и программы HyperChem. Масс-спектрометрический анализ проведен на квадрупольном масс-анализаторе в режиме регистрации положительных ионов в диапазоне  $m/z$  100-1000. В результате исследования установлено, что описанные в нормативных документах посторонние примеси верапамила и лизиноприла являются продуктами деструкции веществ. Прогнозирование продуктов разложения лизиноприла дигидрата полностью подтвердилось данными хроматограмм ионного тока и масс-спектрами веществ. Однако в случае с верапамилем результаты моделирования продуктов деструкции совпали с результатами ВЭЖХ-МС анализа только для двух из четырех спрогнозированных веществ.*

*Ключевые слова: деструкция, верапамил, лизиноприл, прогнозирование, ВЭЖХ-МС анализ.*

### **Введение**

Определение примесей и продуктов деструкции лекарственных веществ (ЛВ) является актуальной и важной задачей, т.к. эти показатели во многом обуславливают качество фармацевтических препаратов. Важность и необходимость контроля чистоты обусловлена ещё и тем, что присутствие посторонних примесей в ЛВ не только снижает их фармакологическое действие, но и часто делает их опасными для здоровья человека.

Нормирование предела содержания примесей (в том числе продуктов деструкции) лекарственного препарата является обязательным при составлении нормативной документации на ЛВ. В связи с этим при разработке новой фармацевтической композиции гипотензивного действия, содержащей верапамил гидрохлорид и лизиноприл дигидрат, необходимо было разработать методики определения примесей и возможных продуктов деструкции исследуемых веществ.

В настоящее время все больший интерес вызывает возможность компьютерного моделирования процессов синтеза, деструкции лекарственных веществ, прогнозирование их фармакологической активности [1]. Определенный интерес представляет прогнозирование методами компьютерных технологий и экспериментальное подтверждение полученных результатов.

Цель представленной работы заключается в прогнозировании и определении посторонних примесей и продуктов деструкции верапамила и лизиноприла с использованием методов компьютерного моделирования и высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией.

### **Материалы и методы**

Создание компьютерных моделей молекул лекарственных веществ и возможных продуктов их деструкции, а также расчет значений энтропий ( $\Delta S$ ) и энтальпий ( $\Delta H$ ) образования соединений проводили с использованием компьютерной программы HyperChem. Геометрию полученных молекул оптимизировали с помощью метода RM1 [2].

ВЭЖХ-МС анализ проводили, используя водные растворы верапамила гидрохлорида и лизиноприла дигидрата в концентрации 1 мг/мл. При этом часть образцов подвергали деструкции путем термического воздействия (60° и 120°С) согласно работе Н.А. Эпштейна [3, 4].

Анализ образцов верапамила и лизиноприла проводили на жидкостном хроматографе Ultimate-3000 (Dionex, США) с масс-селективным детектором. Условия ВЭЖХ: градиентный режим элюирования; колонка длиной 15 см с сорбентом Силасорб С18; скорость потока подвижной фазы 0,3 мл/мин; объем вводимой пробы – 20 мкл; детектирование осуществляли при длине волны 230 нм. В качестве подвижной фазы при анализе образца верапамила гидрохлорида использовали смесь ацетонитрил (от 20 до 50%) – 2% раствор муравьиной кислоты (от 80 до 50%); при анализе образца лизиноприла дигидрата – ацетонитрил (от 10 до 50%) – 2% раствор муравьиной кислоты (от 90 до 50%). Время анализа для лизиноприла дигидрата и верапамила гидрохлорида составляло 30 и 45 мин соответственно. Масс-спектрометрический анализ осуществляли на квадрупольном масс-анализаторе типа «ионная ловушка»

(Bruker, Германия), оснащенном источником ионов с электрораспылительной ионизацией, автосамплером и программным обеспечением обработки данных Dataanalysis в режиме регистрации положительных ионов. Напряжение на капилляре и противозлектроде составляло 4,0 кВ и – 500 В соответственно. Давление на распылителе составляло 1 атм. Скорость потока газа-осушителя (азот) - 5 л/мин. Температура в камере ионизации - 220°C. Сканирование по полному ионному току проводили в диапазоне m/z 100-1000.

### Результаты и их обсуждение

Используя методы компьютерных технологий для расчета термодинамических характеристик веществ, были спрогнозированы возможные пути разложения верапамила гидрохлорида и лизиноприла дигидрата [5]. Согласно полученным данным, исследуемые вещества подвергаются деструкции по следующим направлениям:

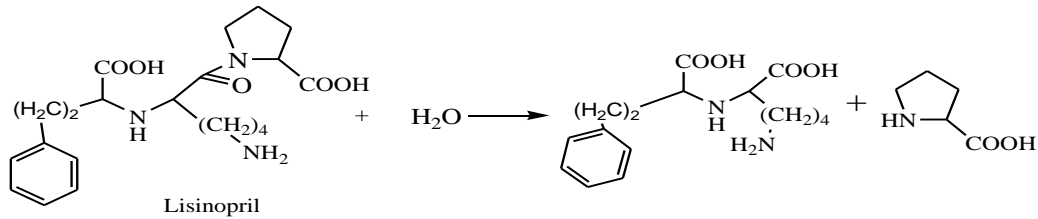


Схема реакции 1

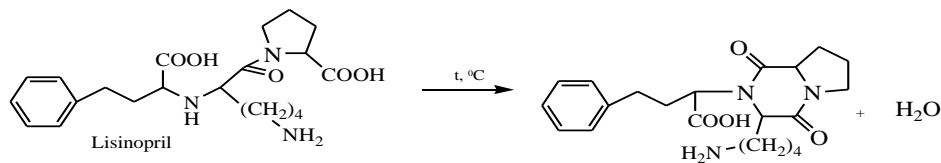


Схема реакции 2

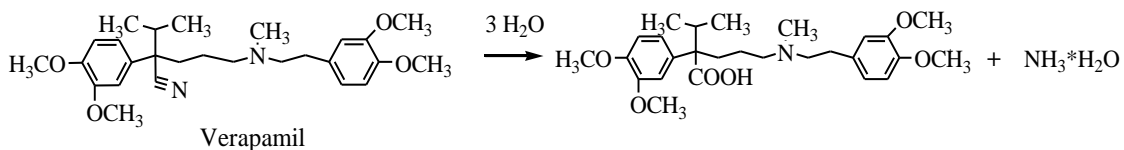


Схема реакции 3

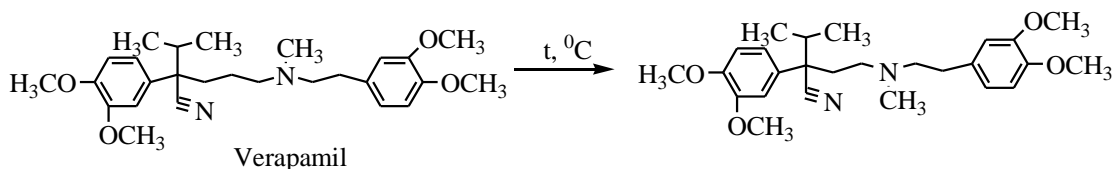


Схема реакции 4

Расчеты, проведенные с помощью программы HyperChem, указывают на то, что процесс деструкции лизиноприла в первую очередь связан с образованием diketопиперазина (схема реакции 2). Разложение верапамила теоретически первоначально связано с уменьшением углеводородной цепи (схема реакции 4).

Наличие спрогнозированных продуктов деструкции исследуемых веществ, а также возможных примесей иного характера, изучали методом ВЭЖХ-МС. На первом этапе в режиме положительной ионизации снимали масс-спектры исходных растворов верапамила и лизиноприла. В ходе эксперимента выявили, что образец лизиноприла не содержит предполагаемых продуктов деструкции, однако на хроматограмме ионного тока обнаружили примеси с молекулярными массами (М.м.) 387,47 и 405,49, которые соответствуют по М.м. веществам, указанным в ОФС 42-0252-07: diketопиперазину и изомеру лизиноприла (R,S,S - лизиноприл) (рис. 1).

При анализе исходного раствора верапамила (рис. 2) было подтверждено наличие вещества с М.м 440,48, которая соответствует примеси В, указанной в ФС 42-0224-07: (α-{2[[2[-3,4-диметоксифенил]этил]метиламино]этил}-3,4-диметокси-α-(1-метилэтил) - фенилацетонитрил моногидрохлорид. Такую же М.м. имеет и спрогнозированный нами норверапамил.

Однако результаты термодинамических расчетов показывают, что процесс N-деметилирования и, соответственно, образование норверапамила является маловероятным. Ввиду этого логично предпо-

ложить, что обнаруженное на масс-спектре вещество с М.м. 440,58, соответствует примеси В, моделирование и образование которой подтверждается расчетами термодинамических величин.

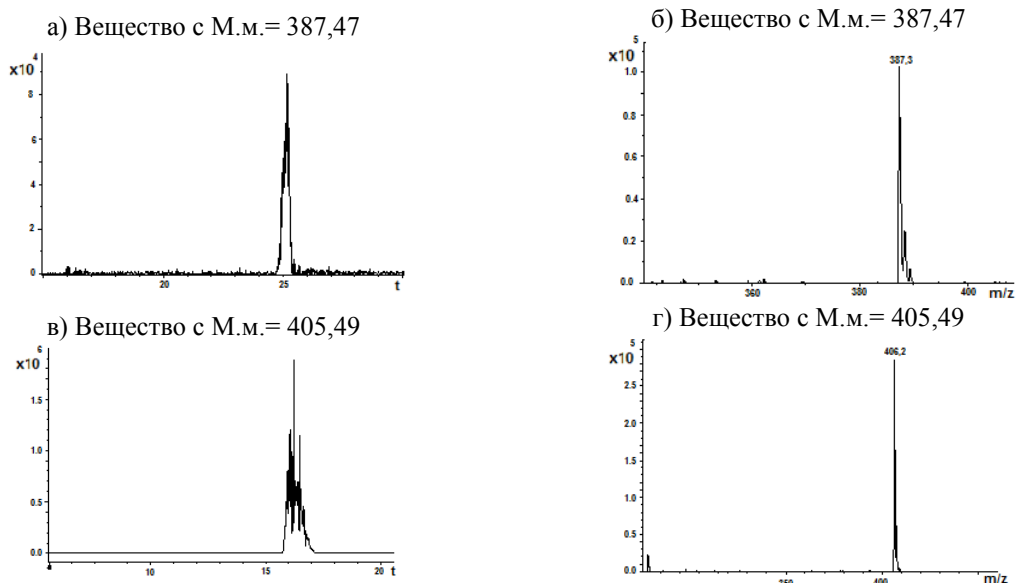


Рисунок 1 – Хроматограммы ионного тока (а, в) и масс-спектры (б, г) выделенных примесей лизиноприла дигидрата

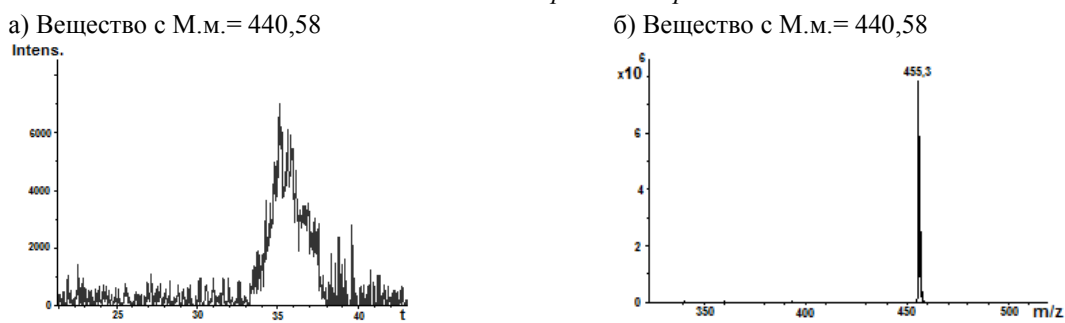


Рисунок 2 – Хроматограмма ионного тока (а) и масс-спектр (б) выделенной примеси верапамила гидрохлорида

Следующим этапом был анализ образцов исследуемых веществ, подвергшихся термическому разложению. В опытном образце деструктурированного раствора лизиноприла нами были обнаружены примеси (помимо дикетопиперазина) с М.м. 308,37 и 115,13, соответствующими М.м. спрогнозированных продуктов деструкции: 6-амино-2-(1-карбокси-3-фенилпропиламино) гексановой кислоты, пирролидин-2-карбоновой кислоты, а также примесь с М.м. 179, соответствующей таковой 2-амино-4-фенил бутановой кислоты, указанной в ФС 42-0252-07 (рис.3).

Сигнал ионного тока вещества с М.м. 387,47, соответствующей дикетопиперазину, после термической деструкции раствора лизиноприла усилился, что подтверждает результаты компьютерного моделирования процесса разложения лекарственного вещества. Образование 2-амино-4-фенил бутановой кислоты, согласно данным термодинамических расчетов, не представлялось реальным вследствие низкой вероятности протекания процесса гидролиза по вторичной аминогруппе. Это подтверждается и низкой интенсивностью сигнала соединения по сравнению с другими обнаруженными веществами (рис. 3, д), и обнаружением его в растворе, подвергнутому агрессивному термическому воздействию (120 °С, 48 ч).

В растворе верапамила, подвергнутого деструкции, интенсивность сигнала обнаруженной примеси с М.м.=440,58, соответствующей примеси В, значительно выше, чем в исходном растворе. При этом пик вещества на выделенном участке хроматограммы ионного тока неоднороден (рис. 4, а,б), что может быть связано с несовершенными условиями анализа и вероятностью регистрации сразу нескольких веществ-изомеров. В любом случае, учитывая интенсивность сигнала, подтверждается предположение, что указанные вещества являются продуктами разложения верапамила гидрохлорида.

В растворе верапамила, который подвергался термическому воздействию, также было обнаружено вещество 2-(3,4-диметоксифенил)-2-изопропил-5-(метиламино)пентанитрил (рис. 4, в,г), образование которого было спрогнозировано, но согласно термодинамическим расчетам являлось маловероят-

ным. Данное соединение также представлено как примесь F верапамила гидрохлорида в Британской фармакопее 2009 г.

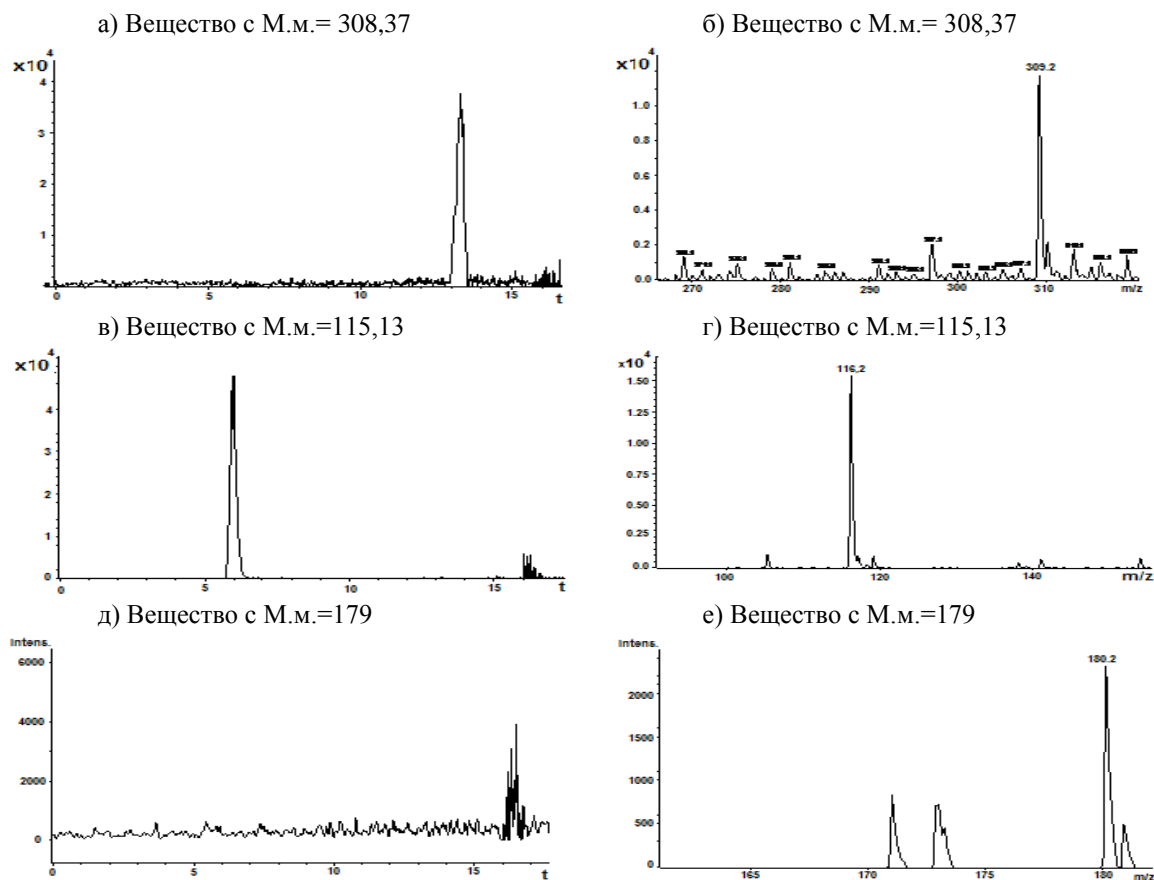


Рисунок 3 – Хроматограммы ионного тока (а, в, д) и масс-спектры (б, г, е) выделенных веществ деструктурированного раствора лизиноприла дигидрата

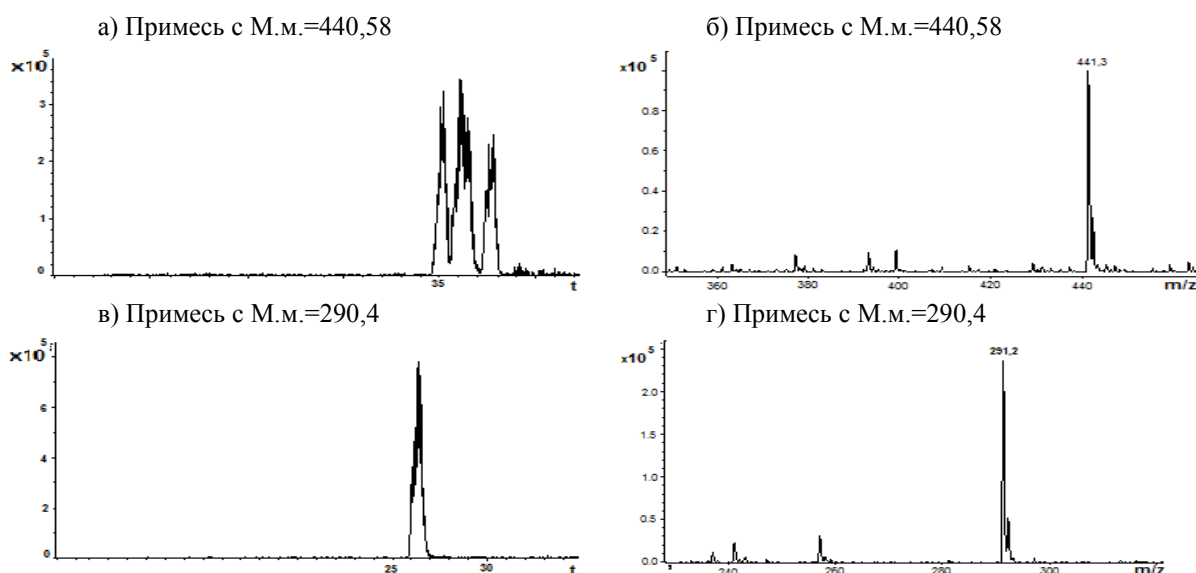


Рисунок 4 – Хроматограммы ионного тока (а, в) и масс-спектры (б, г) выделенных веществ деструктурированного раствора верапамила гидрохлорида

Полученные данные с использованием программ компьютерного моделирования и метода ВЭЖХ-МС анализа были сведены в общую таблицу, позволяющую систематизировать и наглядно представить результаты исследований (таблица 1).

С помощью прогнозирования и ВЭЖХ-МС анализа установлено, что примеси, указанные в ФС на верапамила гидрохлорид и лизиноприла дигидрат, очевидно, являются продуктами деструкции веществ (табл. 1). Результаты исследования разложившегося образца лизиноприла подтверждают данные термодинамических расчетов об образовании в процессе разложения вещества 6-амино-2-(1-карбокси-3-фенилпропиламино)гексановой кислоты и пирролидин-2-карбоновой кислоты. Однако в случае верапамила наблюдается некоторое расхождение теоретического моделирования и результатов эксперимента методом ВЭЖХ-МС. Так образование 2-(3,4-диметоксифенил)-2-изопропил-5-(метиламино)пентанитрила, согласно смоделированной схеме реакции, термодинамически невозможно, но практически представлено с помощью хроматограммы ионного тока и масс-спектра. Наличие 5-((3,4-диметоксифенилэтил)(метил)амино-2-(3,4-диметокси-фенил)-2-изопропил-пентановой кислоты обосновано теоретическими расчетами, но не выявлено в процессе хроматографирования, так как, вероятно, для ее получения следует проводить деструкцию в более жестких условиях.

Таблица 1 – Результаты прогнозирования и ВЭЖХ-МС анализа примесей/продуктов деструкции лизиноприла дигидрата и верапамила гидрохлорида в образцах, подвергнутых деструкции

Лекарственное вещество	Исследуемые соединения	М.м.	Примеси, согласно ФС	Определение веществ методами		
				Компьютерное моделирование		ВЭЖХ-МС анализ
				предполагаемые схемы реакций	термодинамический расчет	
Лизиноприла дигидрат	Дикетопиперазин	387,47	+	+	+	+
	6-амино-2-(1-карбокси-3-фенилпропиламино)гексановая кислота	308,37	-	+	+	+
	Пирролидин-2-карбоновая кислота	115,13	-	+	+	+
	2-амино-4-фенилбутановая кислота	179	+	+	-	+
	R,S,S - лизиноприл	405,49	+	+	+	+
Верапамила гидрохлорид	( $\alpha$ -2[[2[-3,4-диметоксифенил)-этил]метиламино]этил}-3,4-диметокси- $\alpha$ -(1-метилэтил)-фенилацетонитрил моногидрохлорид (примесь В)	440,58	+	+	+	+
	Норверапамил	440,58	-	-	-	-
	2-(3,4-диметоксифенил)-2-изопропил-5-(метиламино)-пентанитрил	290,4	-	+	-	+
	5-((3,4-диметоксифенилэтил)-(метил)амино-2-(3,4-диметоксифенил)-2-изопропилпентановая кислота	473,6	-	+	+	-

### Выводы

В ходе исследования, согласно данным компьютерного моделирования и ВЭЖХ-МС анализа, установлено, что описанные в ФС посторонние вещества в образцах лизиноприла дигидрата и верапамила гидрохлорида являются продуктами деструкции ЛВ. Прогнозирование продуктов разложения лизиноприла дигидрата полностью подтвердилось данными хроматограмм ионного тока и масс-спектрами веществ. Результаты моделирования примесей – продуктов деструкции верапамила гидрохлорида (норверапамил и примесь В) также совпали с экспериментальными данными. Однако результаты прогнозирования двух продуктов деструкции верапамила (2-(3,4-диметоксифенил)-2-изопропил-5-(метиламино)пентанитрила, 5-((3,4-диметоксифенилэтил)-(метил)амино-2-(3,4-диметоксифенил)-2-изопропилпентановой кислоты) не совпали с таковыми при ВЭЖХ-МС анализе. Таким образом, наиболее оптимальным является совместное использование расчетных программ компьютерного моделирования и экспериментальных лабораторных исследований с помощью химических и физико-химических методов анализа.

**Литература**

1. Погребняк А.В. Молекулярное моделирование и дизайн биологически активных веществ. – Ростов-на-Дону: СКНЦ ВШ, 2003. – 232 с.
2. Gerd B. Rocha. RM1: A reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I // J. of Computational Chemistry. – 2006. – Vol. 27, №10. – P. 1101-1111.
3. Компанцева Е.В. Использование метода тонкослойной хроматографии для определения верапамила гидрохлорида, лизиноприла дигидрата и продуктов их деструкции при совместном присутствии // Научные ведомости Белгородского государственного университета. – 2012.-Т.135,№16.-С.123-127.
4. Эпштейн Н.А. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе (обзор) // Хим.-фармац. журн. – 2004. – Т.38, №4. – С. 40–56.
5. Бабьяк А.В. Расчет термодинамических характеристик и прогнозирование процессов деструкции верапамила гидрохлорида и лизиноприла дигидрата // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр.- Пятигорск, 2012.- Вып. 67. – С. 210-213.

\*\*\*

*Компанцева Евгения Владимировна – доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ. Область научных интересов: фармацевтический анализ синтетических лекарственных веществ и биологически активных веществ в лекарственном растительном сырье, стандартизация лекарственных средств. E-mail: dskompanceva@mail.ru*

*Бабьяк Анна Валерьевна – аспирант кафедры фармацевтической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ. Область научных интересов: фармацевтический анализ, стандартизация лекарственных средств, гипотензивные лекарственные средства. E-mail: annav.babyak@gmail.com (автор для переписки)*

*Мудрецова Юлия Викторовна – аспирант кафедры фармацевтической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ. Область научных интересов: фармацевтический анализ лекарственных веществ растительного и синтетического происхождения. E-mail: mydraya.yuliya@yandex.ru*

*Глушко Александр Алексеевич – кандидат фармацевтических наук, преподаватель кафедры физической и коллоидной химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ. Область научных интересов: компьютерная химия, разработка программного обеспечения для молекулярного моделирования, молекулярный докинг, молекулярная динамика. E-mail: saha-omega@yandex.ru*