

## РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РОДСТВЕННЫХ ПРИМЕСЕЙ В СУБСТАНЦИИ НОВОГО СОЕДИНЕНИЯ ПЕПТИДНОЙ СТРУКТУРЫ ГК-2

Л.Н. Грушевская, М.С. Сергеева, Л.М. Гаевая, М.Е. Дуденкова, Е.Д. Денисенко, Н.И. Авдюнина, С.В. Минаев, Н.М. Сазонова

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» РАМН

Исследование посвящено разработке методики определения родственных примесей в субстанции оригинального дипептидного миметика четвертой петли фактора роста нервов – ГК-2 и проведено с применением методов тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием (ВЭЖХ и ТСХ). Разработана методика определения содержания родственных примесей в субстанции, включающая две стадии: анализ с помощью тонкослойной хроматографии и анализ с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Разработанная методика позволяет обнаружить примеси в субстанции в содержании 0,1 % и более.

**Ключевые слова:** ГК-2, субстанция, анализ, родственные примеси, посторонние примеси, методика, высокоэффективная жидкостная хроматография, тонкослойная хроматография.

DOI 10.19163/1994-9480-2018-4(68)-97-101

## DEVELOPMENT OF THE TECHNIQUE FOR DETERMINATION OF NATURAL IMPURITIES IN THE SUBSTANCE OF A NEW CONNECTION OF GK-2 PEPTIDE STRUCTURE

L.N. Grushevskaya, M.S. Sergeeva, L.M. Gaevaya, M.E. Dudenkova, E.D. Denisenko, N.I. Avdyunina, S.V. Minaev, N.M. Sazonova

FSBSI «Research Institute of Pharmacology named after V.V. Zakusov» RAMS

The study is devoted to the development of related substances determination technique in the original dipeptide, which is fourth loop of nerve growth factor mimetic – GK-2, and was carried out using methods of thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection (HPLC and TLC). The technique for determining of the related impurities content includes two stages: analysis by thin-layer chromatography and analysis by high-performance liquid chromatography. The developed technique allows detecting impurities in the substance in the content of 0,1 % and more.

**Key words:** GK-2, substance, analysis, related substances, foreign substances, technique, high-performance liquid chromatography, thin-layer chromatography.

ГК-2 – дипептидный миметик четвертой петли фактора роста нервов, гексаметилендиамид бис-(N-моно-сукцинил-L-глутамил-L-лизина), представляет собой оригинальное соединение, синтезированное в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Соединение проявляет нейропротективную, антиишемическую, противоинсультную, антипаркинсоническую активность, показало эффективность на моделях болезни Альцгеймера [1–3].

### ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Разработка методики определения родственных примесей в субстанции ГК-2 для дальнейшей ее стандартизации и разработки лекарственных препаратов на ее основе.

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ проведен на трех образцах субстанции ГК-2, синтезированных в отделе химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (рис. 1).

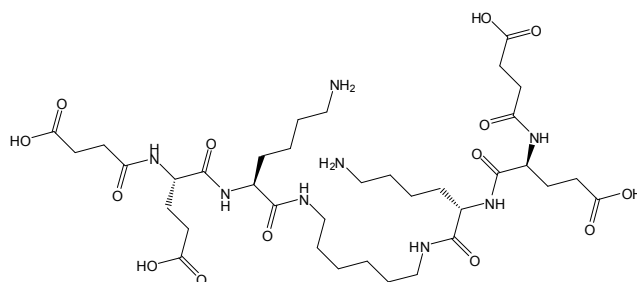


Рис. 1. Структурная формула ГК-2

При разработке методики были использованы образцы исходных и промежуточных продуктов синтеза ГК-2: дциклогексилмочевина (примесь 2), гексаметилендиамин (примесь 3), Z-L-Glu('Bu)OSu (примесь 5), N-гидроксисукцинимид (примесь 6), (Z-L-Lys(Boc)-NH)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (примесь 7), (H-L-Lys(Boc)-NH)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (примесь 8), N,N-диметил-1,3-пропандиамин (примесь 9), (Z-L-Glu(OBu<sup>t</sup>)-L-Lys(Boc)-NH)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (примесь 10), (HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CO-L-Glu('Bu)-L-Lys(Boc)-NH)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (примесь 12).

Образцы промежуточных продуктов синтеза были предоставлены для исследований отделом химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (рук. отдела Т.А. Гудашева). Из исходных продуктов синтеза были использованы дициклогексилмочевина Aldrich; гексаметилендиамин Sigma-Aldrich; N-гидроксисукцинимид AlfaAesar; N,N-диметил-1,3-пропандиамин AlfaAesar.

Исходя из особенностей структуры и растворимости анализируемых соединений, а также вероятности их появления в конечном продукте, все соединения были разделены на две группы. Содержание этих двух групп примесей в субстанции было предложено определять разными методами: содержание примесей 2, 3, 6 и 9 – методом тонкослойной хроматографии (ТСХ), а примесей 5, 7, 8, 10 и 12 – методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) со спектрофотометрическим детектированием.

Разработка методики ТСХ выполнена на пластинках Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck), детектирование в УФ-свете (254 нм,) в парах йода и раствором нингидрина в этаноле (1,0 г нингидрина в 50 мл этанола и 10 мл ледяной уксусной кислоты). Разработка методики ВЭЖХ проведена на жидкостном хроматографе Shimadzu LC 10.

**Метод тонкослойной хроматографии.** Для идентификации и полуколичественного определения примесей 2, 3, 6 и 9 в субстанции ГК-2 был предложен метод ТСХ.

На основании анализа литературы и, учитывая структуру исследуемых соединений, для разделения ГК-2 и примесей опробовали более 30 различных элюирующих систем, ряд которых представлен в табл. 1.

На хроматографическую пластинку наносили 200 мкг ГК-2 и по 10 мкг каждой исследуемой примеси. Детектирование зон адсорбции проводили в УФ-свете при длине волны 254 нм, а затем в камере, насыщенной парами йода. В УФ-свете обнаруживалась только примесь 6, в парах йода обнаруживались ГК-2 и все технологические примеси.

Как видно из табл. 1, приемлемого разделения ГК-2 и его технологических примесей удалось добиться в системах 7.1–7.4, при этом оптимальная форма пятен наблюдалась в системе 7.1. Недостатком данной системы являлась недостаточно четкая визуализация примеси 2, поэтому полуколичественную оценку содержания этой примеси решено было проводить с использованием системы растворителей 1 (где, кроме примеси 2, другие соединения с линии старта не элюировались).

Оценку селективности системы растворителей 1 (CCl<sub>4</sub>: этанол: NH<sub>3</sub> концентрированный (100:50:3)) не проводили.

Оценку селективности элюирующей системы метанол: ледяная уксусная кислота: H<sub>2</sub>O (20:5:10) (система 7.1) проводили по величине коэффициента разделения  $\eta$ , рассчитанного по формуле  $\eta = \Delta Rf_{1-2} \times L / 0,5 (l_1 + l_2)$ , где  $\Delta Rf_{1-2}$  – разность величин Rf соседних пятен, L – длина пробега растворителя, l<sub>1</sub> и l<sub>2</sub> – длина продольного сечения соседних зон адсорбции.

Параметры разделения составили: для примесей 9 и 3 – 4,6; для примеси 3 и ГК-2 – 3,7; для ГК-2 и примеси 6 – 1,7 и для примесей 6 и 2 – 1,7. Значение коэффициентов разделения для всех пар соединений превышало 1,5, следовательно, разделение ГК-2 и его технологических примесей полное. Пределы обнаружения примесей представлены в табл. 2.

Разделение ГК-2 и исследуемых примесей в выбранных концентрациях было изучено на модельных смесях. На хроматограмму наносили от 500 до 1500 мкг ГК-2 и по 1-3 мкг технологических примесей (рис. 2 и 3).

По результатам проведенных экспериментов для оценки содержания примеси 2 в субстанции ГК-2 была выбрана система растворителей четыреххлористый углерод – этанол – раствор аммиака концентрированный (100:50:3), проявление хроматограммы в парах йода, растворитель для испытуемой пробы – этанол.

Таблица 1

**Системы растворителей для хроматографического разделения ГК-2 и технологических примесей**

| ПФ  | Система растворителей  | Значение Rf |           |           |           |           |
|-----|--|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|     |  | ГК-2        | примесь 2 | примесь 3 | примесь 6 | примесь 9 |
| 1   | CCl <sub>4</sub> : этанол: NH <sub>3</sub> конц. (100:50:3)          | 0           | 0,69      | 0         | 0,08      | 0         |
| 2   | Диоксан: метанол: NH <sub>3</sub> конц. (4:40:1)                     | 0           | 0,82      | 0         | 0,49      | 0         |
| 3   | н-бутанол: ЛУК: H <sub>2</sub> O (4:1:1)                             | 0,10        | 0,91      | 0,10      | 0,54      | 0,05      |
| 4   | Этилацетат: ЛУК: H <sub>2</sub> O (13:1:0,1)                         | 0           | 0,90      | 0         | 0,58      | 0         |
| 5   | Толуол: ацетон: этанол: NH <sub>3</sub> конц. (48:20:10:2)           | 0           | 0,90      | 0,08      | 0         | 0,05      |
| 6   | Диоксан: метанол: NH <sub>3</sub> конц.: H <sub>2</sub> O (4:40:1:1) | 0,30        | 0,90      | 0,05      | 0,75      | 0,05      |
| 7.1 | Метанол: ЛУК: H <sub>2</sub> O (20:5:10)                             | 0,75        | 0,90      | 0,53      | 0,82      | 0,39      |
| 7.2 | (20:10:5)  | 0,65        | 0,90      | 0,41      | 0,81      | 0,23      |
| 7.3 | (20:10:10)   | 0,65        | 0,90      | 0,55      | 0,81      | 0,38      |
| 7.4 | (16:8:4)   | 0,40        | 0,91      | 0,49      | 0,81      | 0,26      |
| 8   | Метанол: NH <sub>3</sub> конц.: H <sub>2</sub> O (20:5:10)           | 0,70        | 0,90      | 0,06      | 0,80      | 0,14      |
| 9   | Метанол: H <sub>2</sub> O (20:10)                                    | 0,7         | 0         | 0         | 0         | 0         |
| 10  | CHCl <sub>3</sub> : метанол: ЛУК: H <sub>2</sub> O (8:8:2:4)         | 0,27        | 0         | 0,24      | 0,79      | 0,12      |
| 11  | CCl <sub>4</sub> : метанол: ЛУК (30:15:1)                            | 0           | 0,95      | 0,04      | 0,51      | 0,03      |

Таблица 2

### Оценка чувствительности технологических примесей ГК-2, мкг

| Соединение | Способы и пределы обнаружения |           |                              |
|------------|-------------------------------|-----------|------------------------------|
|            | УФ-свет 254 нм                | пары йода | спиртовой раствор нингидрина |
| Примесь 2  | –                             | 3,0       | –                            |
| Примесь 3  | –                             | 0,4       | 0,08                         |
| Примесь 6  | 0,1                           | 4,0       | –                            |
| Примесь 9  | –                             | 1,0       | 0,08                         |

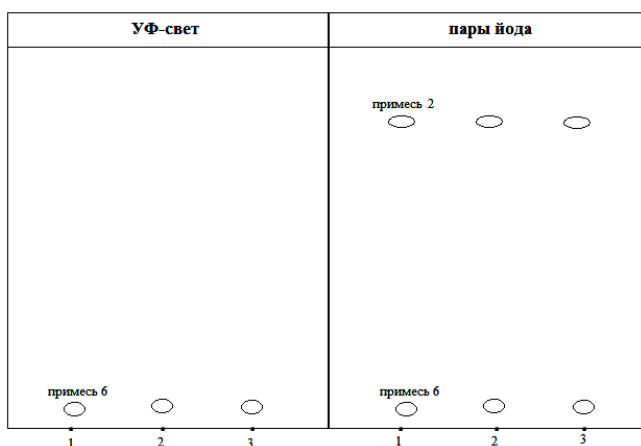


Рис. 2. Хроматограмма модельной смеси ГК-2 и технологических примесей в системе растворителей четыреххлористый углерод – этанол – раствор аммиака конц. (100:50:3) (1 – раствор свидетелей примесей (по 3 мг примесей 2, 3, 6 и 9); 2 – модельная смесь ГК-2 и примесей в растворе 1 (1500 мкг ГК-2 + по 3 мкг примесей 2,3,6 и 9); 3 – модельная смесь ГК-2 и примесей в растворе 2 (1500 мкг ГК-2 + по 3 мкг примесей 2,3,6 и 9))

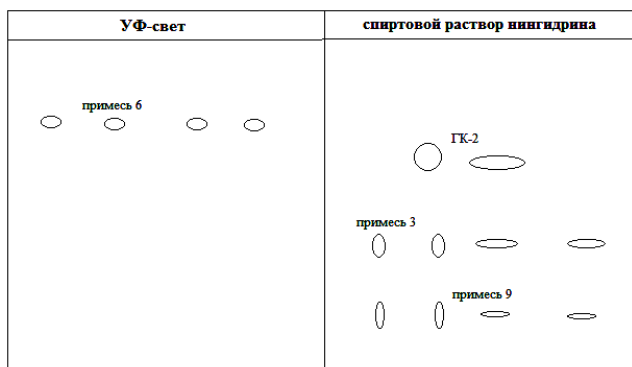


Рис. 3. Хроматограмма модельной смеси ГК-2 и технологических примесей в системе растворителей метанол – ледяная уксусная кислота – вода очищенная (20:5:10) (1 – раствор свидетелей примесей (по 0,2 мг примесей 3,6 и 9) при нанесении в точку; 2 – модельная смесь ГК-2 и примесей (200 мкг ГК-2 + по 0,2 мкг примесей 3,6 и 9) при нанесении в точку; 3 – модельная смесь ГК-2 и примесей (200 мкг ГК-2 + по 0,2 мкг примесей 3, 6 и 9) при нанесении полоской в 1 см; 4 – раствор свидетелей примесей (по 0,2 мг примесей 3, 6 и 9) при нанесении полоской в 1 см)

Оценку содержания примесей 3, 6 и 9 было решено проводить в системе растворителей метанол – ледяная уксусная кислота – вода очищенная (20:5:10), проявление хроматограммы – в УФ-свете и спиртовым раствором нингидрина, растворитель для испытуемой пробы субстанции – вода очищенная.

В разработанных условиях проведено определение родственных примесей в образцах субстанции ГК-2.

Определение примеси 2: 0,1 г субстанции растворяли в 1 мл этанола, встряхивали 2 мин и оставляли на 5 мин. На линию старта хроматографической пластинки наносили 15 мкл надосадочной жидкости. Пластинку с нанесенными пробами высушивали на воздухе в течение 15 мин, помещали в насыщенную в течение 20 мин камеру со смесью растворителей четыреххлористый углерод – этанол – концентрированный раствор аммиака (100:50:3) и хроматографировали восходящим способом. Когда фронт растворителя проходил 10 см от линии старта, пластинку вынимали из камеры, высушивали на воздухе до отсутствия запаха растворителей и помещали в камеру, насыщенную парами йода, на 20 мин.

Определение примесей 3, 6 и 9: 0,2 г субстанции растворяли в 5 мл воды очищенной. На линию старта хроматографической пластинки наносили 5 мкл полученного раствора полоской длиной 1 см. Пластинку с нанесенными пробами высушивали на воздухе в течение 15 мин, помещали в насыщенную в течение 20 минут камеру со смесью растворителей метанол – ледяная уксусная кислота – вода очищенная (20:5:10) и хроматографировали восходящим способом. Когда фронт растворителя проходил 10 см от линии старта, пластинку вынимали из камеры, высушивали в сушильном шкафу в течение 20 мин при 105 °С, просматривали в УФ-свете при длине волны 254 нм, а затем обрабатывали спиртовым раствором нингидрина и снова помещали в сушильный шкаф на 10 мин при температуре 105 °С. Результаты анализа образцов субстанции ГК-2 представлены в табл. 3.

Таблица 3

### Результаты определения примесей в образцах субстанции ГК-2, %

| Технологическая примесь | Номер образца             |                           |                           |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                         | 210116                    | 220116                    | 230116                    |
| Примесь 2               | не обнаружено (менее 0,2) | не обнаружено (менее 0,2) | не обнаружено (менее 0,2) |
| Примесь 3               | менее 0,1                 | менее 0,1                 | менее 0,1                 |
| Примесь 6               | не обнаружено (менее 0,1) | не обнаружено (менее 0,1) | не обнаружено (менее 0,1) |
| Примесь 9               | не обнаружено (менее 0,1) | не обнаружено (менее 0,1) | не обнаружено (менее 0,1) |

Таким образом, в образцах субстанции ГК-2 с помощью разработанной методики была обнаружена только одна примесь, величина Rf которой соответствовала величине Rf примеси 3, в содержании менее 0,1 %, что составляет менее контролируемого предела для примесей в пептидах, полученных синтетическим путем (ГФ РФ XIII, том 1, с. 182).

Других известных технологических примесей (примеси 2, 6 и 9), а также любых других примесей в образцах субстанции с помощью разработанной методики обнаружено не было.

**Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии.** Аналитическая длина волны детектора была выбрана на основании анализа УФ-спектров растворов ГК-2 и технологических примесей 5, 7, 8, 10 и 12, она составила 210 нм.

В результате проведенных исследований по выбору хроматографических условий было показано, что кроме известных технологических примесей в образцах субстанции могут также присутствовать и неидентифицированные примеси, до 14 примесей в образце. При попытках поиска оптимальных хроматографических условий, полного разделения пиков всех технологических и неидентифицированных примесей между собой добиться не удалось: одновременно полностью разделить удавалось либо группу технологических примесей, либо группу неидентифицированных примесей.

Поскольку исследования показали, что во всех образцах субстанции ГК-2 содержание примесей, соответствующих по временам удерживания свидетелям технологических примесей, было либо незначительно, либо эти примеси отсутствовали вовсе, нами было принято решение проводить анализ образцов субстанции в приведенных ниже условиях.

Для анализа использовали стальную колонку 150 x 4,6 мм BDS Hypersil C18, 5 мкм (Thermo scientific), подвижная фаза – смесь 0,02 М раствора калия гидрофосфата одноосновного (рН раствора доводили до 2,7 фосфорной кислотой), метанола и ацетонитрила (180:20:10). Режим элюирования изократический, скорость потока подвижной фазы – 1 мл/мин, температура колонки комнатная, объем пробы 20 мкл.

В указанных выше условиях элюирование технологических примесей наблюдалось в интервале от 1,5 до 3,0 мин, относительные времена удерживания примесей 5, 7, 8, 10 и 12 составляли около 0,29; 0,36; 0,29; 0,29 и 0,28 соответственно. Время удерживания ГК-2 составляло около 6 мин. Разделение неидентифицированных примесей наблюдалось достаточно полное (рис. 4).

Для оценки содержания примесей в субстанции был использован метод внешнего стандарта (стандарт – раствор рабочего стандартного образца (PCO) субстанции ГК-2).

Линейная зависимость площади пика ГК-2 от концентрации его растворов была подтверждена в пределах интервала концентраций от 0,002 до 0,2 мг/мл (рис. 5).

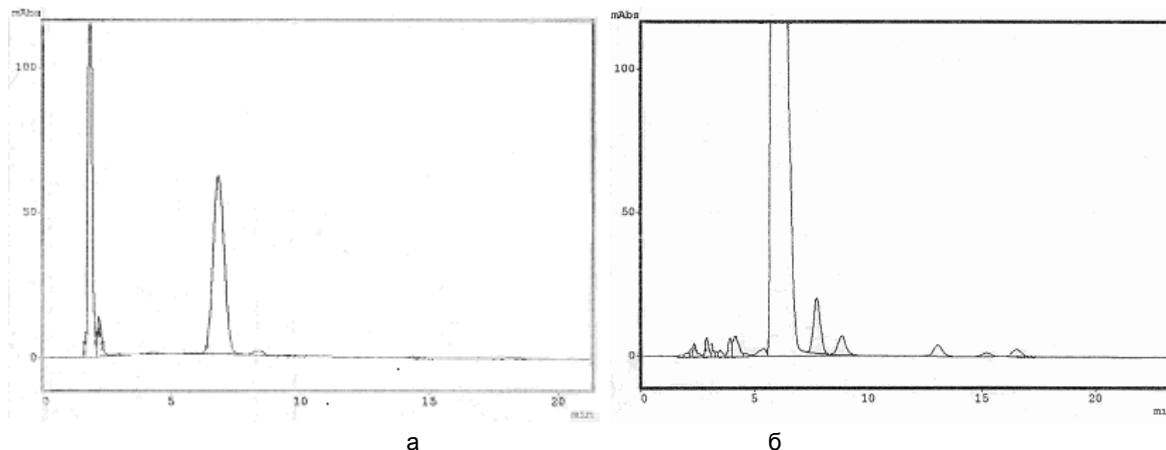


Рис. 4. Хроматограмма: а – модельной смеси ГК-2 и примесей 5, 7, 8, 10 и 12 (концентрация каждого соединения – 0,1 мг/мл); б – образца субстанции ГК-2 (концентрация ГК-2 в растворе – 1 мг/мл)

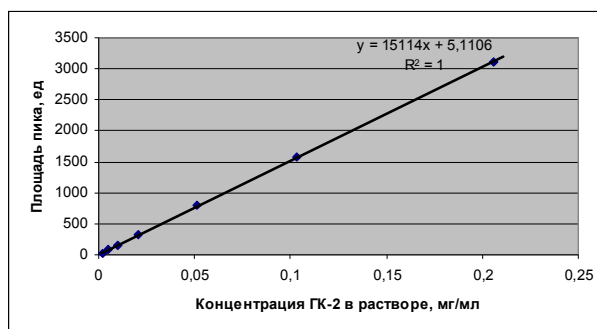


Рис. 5. Зависимость площади пика от концентрации растворов ГК-2

Содержание примесей в образцах субстанции представлено в табл. 4. Как видно, лишь в одном из образцов была обнаружена примесь со временем удерживания, близким к времени удерживания известных технологических примесей, однако содержание ее было ниже контролируемого предела для пептидов, полученных синтетическим путем (0,1 %). Содержание единичной примеси составляло не более 2,5 %, суммарное содержание примесей составляло менее 8 %.

Таблица 4

### Содержание примесей в субстанции ГК-2

| Относительное время удерживания | Содержание примесей, % |        |        |
|---------------------------------|------------------------|--------|--------|
|                                 | 210116                 | 220116 | 230116 |
| 0,27                            | –                      | –      | –      |
| 0,30                            | 0,07                   | –      | –      |
| 0,40                            | 0,30                   | 0,27   | 0,37   |
| 0,49                            | 0,43                   | 0,43   | 0,44   |
| 0,54                            | 0,09                   | 0,09   | 0,10   |
| 0,56                            | –                      | 0,08   | 0,07   |
| 0,59                            | 0,17                   | 0,18   | 0,18   |
| 0,66                            | 0,41                   | 0,43   | 0,41   |
| 0,70                            | 0,82                   | 0,85   | 0,79   |
| 0,78                            | 0,11                   | 0,11   | 0,10   |
| 0,91                            | 0,37                   | 0,34   | 0,36   |
| 1,30                            | 2,50                   | 2,48   | 2,42   |
| 1,49                            | 1,01                   | 1,01   | 0,94   |
| 2,21                            | 0,85                   | 0,70   | 0,69   |
| 2,58                            | 0,23                   | 0,24   | 0,22   |
| 2,81                            | 0,50                   | 0,53   | 0,53   |
| Сумма примесей                  | 7,86                   | 7,74   | 7,62   |

В результате проведенных исследований была выбрана рабочая концентрация испытуемых образцов – 1 мг/мл и концентрация раствора РСО ГК-2 – 0,005 мг/мл.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами разработана методика определения родственных примесей в субстанции ГК-2, состоящая из двух этапов: определение примесей методом ТСХ (технологические примеси 3, 6 и 9) и определение примесей методом ВЭЖХ (технологические

примеси 5, 7, 8, 10 и 12, а также неидентифицированные примеси).

С помощью разработанной методики определено содержание родственных примесей в образцах субстанции ГК-2. Показано, что содержание единичной примеси во всех образцах не превышает 2,5 %, а суммарное содержание примесей – 8 %.

Разработанная методика может быть использована для контроля качества субстанции ГК-2 по показателю «Родственные примеси».

### ЛИТЕРАТУРА

1. Середенин С.Б., Гудашева Т.А. Дипептидные миметики нейротрофинов NGF и BDNF. Патент РФ № 2410392. Изобр. № 3, 2011.
2. Середенин С.Б., Гудашева Т.А. Создание фармакологически активной малой молекулы, обладающей свойствами фактора роста нервов // Журн. неврологии и психиатрии. – № 6. – 2015. – С. 63–70.
3. Gudasheva T.A., Povarnina P.Yu., Antipova T.A., Seredenin S.B. A novel dimeric dipeptide mimetic of the nerve growth factor exhibits pharmacological effects upon systemic administration and has no side effects accompanying the neurotrophin treatment // Neuroscience & Medicine. – № 5. – 2014. – P. 101–108.

### REFERENCES

1. Seredenin S.B., Gudasheva T.A. Dipeptidnye mimitiki nejrotrofinov NGF i BDNF [Dipeptide mimetics of neurotrophins NGF and BDNF]. Patent RF № 2410392. Izobr. № 3, 2011.
2. Seredenin S.B., Gudasheva T.A. Sozdanie farmakologicheskoi aktivnoj maloj molekuly, obladayuschej svojstvami faktora rosta nervov [The creation of a pharmacologically active small molecule with the properties of nerve growth factor]. *ZHurn. nevrologii i psihiatrii* [Journal of Neurology and Psychiatry], no. 6, 2015, pp. 63–70. (In Russ.; abstr. in Engl.).
3. Gudasheva T.A., Povarnina P.Yu., Antipova T.A., Seredenin S.B. A novel dimeric dipeptide mimetic of the nerve growth factor exhibits pharmacological effects upon systemic administration and has no side effects accompanying the neurotrophin treatment. *Neuroscience & Medicine*, no. 5, 2014, pp. 101–108.

### Контактная информация

**Грушевская Любовь Николаевна** – д. ф. н., в. н. с., опытно-технологического отдела ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», e-mail: otopharm@mail.ru