

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ОНКОЛОГИИ
ИМЕНИ Н.Н. БЛОХИНА» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи



Козин Дмитрий Андреевич

**Разработка методов анализа и стандартизации производных
индоло[2,3-а]карбазола, обладающих противоопухолевым действием**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Научные руководители:

доктор фармацевтических наук, профессор

Решетняк Владимир Юрьевич

доктор фармацевтических наук

Шпрах Зоя Сергеевна

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Производные индоло[2,3-а]карбазола, пути получения и природа противоопухолевой активности	15
1.2 Аналитические методы при исследовании производных индоло[2,3-а]карбазола	20
1.2.1 Использование метода ИК-спектрометрии.....	21
1.2.2 Использование метода УФ-спектрофотометрии	24
1.2.3 Использование метода ВЭЖХ	25
1.2.4 Использование метода ТСХ.....	31
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1	37
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	38
2.1 Объекты исследования.....	38
2.2 Реактивы	39
2.3 Оборудование	40
2.4 Методы исследования	42
ГЛАВА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА И РАЗРАБОТКА МЕТОДИК АНАЛИЗА СУБСТАНЦИИ ЛХС-1208.....	44
3.1 Подтверждение структуры ЛХС-1208 спектральными методами.....	44
3.1.1 Подтверждение структуры ЛХС-1208 методом ¹ Н-ЯМР спектрометрии.....	44
3.1.2 Подтверждение структуры ЛХС-1208 методом ИК-спектрометрии.....	45
3.1.3 Подтверждение структуры ЛХС-1208 методом УФ-спектрофотометрии.....	46
3.1.4 Подтверждение структуры ЛХС-1208 методом тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения	48
3.2 Определение физико-химических свойств ЛХС-1208	50
3.2.1 Характеристика внешнего вида.....	50
3.2.2 Определение растворимости	51

3.2.3	Определение удельного вращения	51
3.2.4	Определение органически связанного хлора	52
3.2.5	Определение сульфатной золы и тяжелых металлов	52
3.2.6	Определение содержания воды	53
3.3	Определение примесей и количественного содержания действующего вещества в фармацевтической субстанции ЛХС-1208.....	54
3.4	Разработка проекта спецификации качества для фармацевтической субстанции ЛХС-1208.....	57
3.5	Определение сроков годности фармацевтической субстанции ЛХС-1208.....	59
3.6	Разработка методики определения ЛХС-1208 в биологических жидкостях для изучения доклинической фармакокинетики	63
	ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3	68
	ГЛАВА 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА И РАЗРАБОТКА МЕТОДИК АНАЛИЗА СУБСТАНЦИИ ЛХС-1269.....	69
4.1	Подтверждение структуры ЛХС-1269 спектральными методами.....	69
4.1.1	Применение метода ¹ H-ЯМР спектроскопии	69
4.1.2	Применение метода ИК-спектроскопии	70
4.1.3	Применение метода УФ-спектрофотометрии.....	71
4.1.4	Применение метода тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения	73
4.2	Определение физико-химических свойств фармацевтической субстанции ЛХС-1269.....	75
4.2.1	Характеристика внешнего вида.....	75
4.2.2	Определение растворимости	75
4.2.3	Определение удельного вращения	76
4.2.4	Определение органически связанного хлора	76
4.2.5	Определение сульфатной золы и тяжелых металлов	77
4.2.6	Определение содержания воды	77

4.3 Определение примесей и количественного содержания действующего вещества в фармацевтической субстанции ЛХС-1269.....	78
4.3.1 Определение примесей и количественного содержания методом ВЭЖХ	78
4.3.2 Идентификация примесей в субстанции ЛХС-1269 методом ВЭЖХ-МСМС	83
4.4 Валидация методики определения действующего вещества в субстанции ЛХС-1269 методом ВЭЖХ	91
4.4.1 Специфичность.....	91
4.4.2 Линейность	93
4.4.3 Пределы обнаружения	95
4.4.4 Прецизионность.....	95
4.4.5 Правильность.....	98
4.5 Валидация методики определения примеси ЛХС-1269-У в субстанции ЛХС-1269 методом ВЭЖХ	99
4.5.1 Специфичность.....	99
4.5.2 Линейность	101
4.5.3 Пределы обнаружения	102
4.5.4 Прецизионность.....	102
4.5.5 Правильность.....	104
4.6 Разработка проекта спецификации качества для фармацевтической субстанции ЛХС-1269.....	105
4.7 Определение сроков годности фармацевтической субстанции ЛХС-1269.....	107
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4	111
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	112
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	113
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	115
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	116
БЛАГОДАРНОСТИ	117
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	118

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	120
Приложение А. Акт о внедрении результатов научно-исследовательской работы в учебный процесс.....	137
Приложение Б. Акт о внедрении результатов научной и инновационной деятельности.....	138
Приложение В. Проект спецификации на фармацевтическую субстанцию ЛХС-1208.....	139
Приложение Г. Проект спецификации на фармацевтическую субстанцию ЛХС-1269.....	141

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В настоящее время в Российской Федерации злокачественными опухолями заболевают около 600 тысяч в год [15]. Несмотря на большой выбор противоопухолевых препаратов и разнообразие механизмов действия, их эффективность продолжает оставаться недостаточной. Основными недостатками большинства противоопухолевых лекарственных средств являются возникновение устойчивости к ним у опухолевых клеток, ограниченный спектр действия и высокая токсичность. Поэтому создание эффективных оригинальных отечественных противоопухолевых препаратов по-прежнему сохраняет свою актуальность. Среди многочисленных соединений природного и синтетического происхождения с установленной противоопухолевой активностью все больший научный интерес для практической онкологии вызывают производные индолокарбазола [76; 122; 88]. Столь высокий интерес к этой группе соединений во многом обуславливается их мультитаргетностью [66; 75; 1]. В частности, индолокарбазолы являются ингибиторами ряда протеинкиназ и топоизомераз, играющих важную роль в реакциях фосфорилирования и репликации ДНК, инициируя нарушения клеточного метаболизма и механизма деления клетки [67; 80; 94]. За счет ингибирующей активности эти соединения оказывают цитотоксическое действие, что делает индолокарбазолы перспективными кандидатами на роль противоопухолевых препаратов [18; 44; 87]. На протяжении последних ряда лет сотрудниками лаборатории химического синтеза федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России) синтезирован ряд *N*-гликозидов индоло[2,3-а]карбазола под лабораторным шифром ЛХС [51; 24; 13; 63]. В настоящий момент одними из наиболее перспективных соединений этого

класса являются ЛХС-1208 [26] и ЛХС-1269 [25]. В процессе исследований ЛХС-1208 и ЛХС-1269 показали выраженное цитотоксическое действие как *in vitro*, так и *in vivo* [68; 61]. ЛХС-1208 относится по механизму действия к ингибиторам топоизомеразы I и II, а ЛХС-1269 относится интеркаляторам ДНК и ремодуляторам хроматина [116; 95; 90].

Для дальнейшего продвижения ЛХС-1208 и ЛХС-1269 в практическую онкологию необходимо создание соответствующих нормативных документов для стандартизации новых субстанций. В связи с этим необходимо провести исследование их физико-химических свойств согласно требованиям Государственной Фармакопеи Российской Федерации XIV издания (ГФ РФ XIV) [10] с последующим выявлением наиболее значимых и необходимых параметров для стандартизации.

Степень разработанности темы исследования

Сотрудниками лаборатории химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России разработан метод синтеза *N*-гликозидов индоло[2,3-а]карбазола, обладающих противоопухолевой активностью, и получен ряд соединений этой группы, содержащих различные углеводные остатки. Производные индоло[2,3-а]карбазола, получившие лабораторные шифры ЛХС-1208 и ЛХС-1269, показали наибольшую противоопухолевую активность и были отобраны для дальнейших исследований. Несмотря на то, что сотрудниками лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России под руководством профессора Н.А. Оборотовой проведен значительный объем исследований по разработке моделей лекарственных форм на основе производных индоло[2,3-а]карбазола, ЛХС-1208 и ЛХС-1269 по-прежнему остаются недостаточно изученными. В частности, не разработан комплекс методик для контроля качества и стандартизации ЛХС-1208 и ЛХС-1269 как фармацевтических субстанций, а

известные данные о физико-химических свойствах ЛХС-1208 и ЛХС-1269 продолжали оставаться разрозненными и фрагментарными.

Цель и задачи исследования

Цель исследования – разработка методик анализа и обоснование параметров качества для стандартизации фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи**:

1. Изучить физико-химические свойства и спектральные характеристики фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269.

2. Разработать аналитические методики для подтверждения подлинности фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269.

3. Исследовать хроматографические характеристики для подтверждения подлинности, количественного определения действующего вещества и возможных примесей фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269 методом ВЭЖХ.

4. Разработать методику количественного определения действующего вещества фармацевтической субстанции ЛХС-1208.

5. Идентифицировать примеси, разработать и валидировать методики количественного определения примесей и действующего вещества фармацевтической субстанции ЛХС-1269.

6. Изучить стабильность фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269 при хранении в естественных условиях и установить сроки годности.

7. Обосновать нормы качества и разработать проекты нормативной документации по качеству на фармацевтические субстанции ЛХС-1208 и ЛХС-1269.

Научная новизна

В диссертационном исследовании впервые проведено химико-фармацевтическое изучение фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269. Подтверждена их структура и определены физико-химические свойства и спектральные характеристики. Разработаны методики подтверждения подлинности фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269 методами ИК-спектromетрии и УФ-спектрофотометрии. Подобраны оптимальные условия и разработаны методики количественного определения действующего вещества и примесей в фармацевтической субстанции ЛХС-1208 методом ВЭЖХ. Показана возможность использования метода ВЭЖХ для изучения фармакокинетики ЛХС-1208 и разработана методика подготовки проб для количественного определения ЛХС-1208 в биологическом материале (кровь и моча). Изучены хроматографические характеристики, разработана и валидирована методика количественного определения действующего вещества в субстанции ЛХС-1269. Идентифицированы примеси в субстанции ЛХС-1269, разработана и валидирована методика количественного определения примеси ЛХС-1269-У. Разработаны проекты нормативной документации по качеству на фармацевтические субстанции ЛХС-1208 и ЛХС-1269. Установлены нормы качества, исследована стабильность и определены сроки годности для фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Выполненные исследования позволили изучить физико-химические свойства ЛХС-1208 и ЛХС-1269. Обоснованы показатели качества для ЛХС-1208 и ЛХС-1269 как фармацевтических субстанций и проведена их стандартизация. Для выбранных показателей разработаны и внедрены методики анализа субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269 и составлены проекты нормативной документации. Исследования примесей в фармацевтической субстанции

ЛХС-1269 позволили провести оптимизацию синтеза и уменьшить их содержание в последующих образцах субстанции.

Полученные в ходе экспериментов результаты могут быть использованы в качестве основы для проведения стандартизации и разработки методик контроля качества других биологически активных соединений, относящихся по строению к производным индоло[2,3-а]карбазола как фармацевтических субстанций.

Методология и методы исследования

Работа выполнена в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV, также были учтены рекомендации ряда зарубежных фармакопей и руководств по контролю качества и разработке аналитических методик. В работе применяли физико-химические (ИК-спектроскопия, УФ-спектрофотометрия, тандемная масс-спектрометрия высокого разрешения, поляриметрия, ВЭЖХ, ВЭЖХ-МСМС) и химические (определение тяжелых металлов, определение органически связанного хлора, определение воды по К. Фишеру). Статистическую обработку полученных результатов проводили в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV.

Основные положения, выносимые на защиту

- физико-химические свойства и основные показатели качества для фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269;
- аналитические методики подтверждения подлинности фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269;
- методики количественного определения ЛХС-1208 и ЛХС-1269 методом ВЭЖХ и результаты валидации методики количественного определения целевого вещества и примеси ЛХС-1269-У в субстанции ЛХС-1269;
- результаты идентификации примесей в субстанции ЛХС-1269; результаты разработки и валидации методики количественного определения примесей и действующего вещества фармацевтической субстанции ЛХС-1269;

- показатели стабильности субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269 и результаты установления для них сроков годности;
- нормы качества фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269.

Степень достоверности и апробация результатов работы

Достоверность полученных результатов доказана статистической обработкой результатов эксперимента и валидацией в соответствии с требованием ГФ РФ XIV. Экспериментальные данные получены с применением современных инструментальных методов анализа: спектрометрия ядерного магнитного резонанса, инфракрасная спектрометрия, спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой области, тандемная масс-спектрометрия высокого разрешения, ВЭЖХ, ВЭЖХ-МСМС на поверенном оборудовании. Общие выводы отражают полученные результаты исследований и соответствуют поставленной цели и задачам, что позволяет считать полученные результаты достоверными.

Результаты исследований диссертационной работы доложены на XV Международной (XXIV Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2020); X Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2020); III Международной научно-практической конференции «Гармонизация подходов к фармацевтической разработке» (Москва, 2020); XXIV Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина — человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2021); Первой всероссийской школе для молодых ученых по медицинской химии «MEDCHEMSCHOOL 2021» (Новосибирск, 2021); 5-ой Российской конференции по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2022» (Волгоград, 2022).

Апробация работы состоялась на учебно-методической межкафедральной конференции кафедр химии, аналитической, физической и коллоидной химии,

фармацевтического естествознания, фармацевтической и токсикологической химии имени А.П. Арзамасцева Института фармации имени А.П. Нелюбина, фармацевтической технологии и фармакологии Института профессионального образования ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и лабораторий химико-фармацевтического анализа, химического синтеза, разработки лекарственных форм ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России 28 февраля 2023 г (протокол №5 от 28 февраля 2023 г.).

Личный вклад автора

Личный вклад автора включает выбор и обоснование темы диссертации, публикации и выступления на научных конференциях. Автором интерпретированы ^1H -ЯМР, получены и интерпретированы ИК, УФ и МСМС-спектры, определены значения удельного угла вращения, содержание органически связанного хлора, воды, сульфатной золы и тяжелых металлов. Разработаны методики для подтверждения подлинности и количественного анализа фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269 методами ИК-спектрометрии, УФ-спектрофотометрии, поляриметрии, ВЭЖХ и идентифицированы примеси в субстанции ЛХС-1269. При непосредственном участии автора разработана методика подготовки образцов для определения ЛХС-1208 в биологических жидкостях с помощью разработанной ВЭЖХ-методики и встречный синтез образцов сравнения для идентификации примесей примесей в субстанции ЛХС-1269 методом ВЭЖХ-МСМС. Автором самостоятельно проведена статистическая обработка экспериментальных данных и валидация разработанных методик, составлены проекты нормативной документации (спецификации на фармацевтические субстанции ЛХС-1208 и ЛХС-1269) и сформулированы выводы. Диссертация и автореферат подготовлены автором лично.

Внедрение результатов в практику

Результаты, полученные на основе экспериментальных данных, приведенных в диссертационной работе, нашли применение и внедрены в учебный процесс кафедры химии Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплины «Методы фармакопейного анализа», читаемых студентам по направлению подготовки (специальности) 33.05.01 «Фармация» (Акт внедрения №160 от 7 ноября 2022 г.).

Разработанные методики контроля качества субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269 нашли практическое применение и внедрены в работу лабораторий химико-фармацевтического анализа, фармакологии и токсикологии и химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Акт внедрения от 9 ноября 2022 г.).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту ВАК по научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования научной специальности, конкретно пунктам 2,3,4 паспорта научной специальности.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ кафедры химии Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 01.2.011.68237 «Новые знания и подходы в оценке качества и сертификации биологически активных соединений синтетического и природного происхождения, лекарственных препаратов, изделий медицинской техники (технологические и экологические аспекты)» и планом научно-исследовательских

работ лабораторий химико-фармацевтического анализа, фармакологии и токсикологии и химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, АААА-А20-120031190013-9 «Фармацевтическая разработка и доклинические исследования оригинальных инновационных лекарственных средств с улучшенным профилем безопасности для лечения злокачественных новообразований».

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 10 работ, в том числе научных статей в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России – 1; статей в изданиях, индексируемых в международной базе Scopus – 2; иных публикаций по результатам исследования – 7.

Структура и объем диссертации

Работа изложена на 142 страницах машинописного текста, иллюстрирована 33 таблицами и 57 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов, двух глав собственных исследований, выводов, списка литературы (123 наименования, из которых 66 наименований на иностранных языках) и четырех приложений.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Производные индоло[2,3-а]карбазола, пути получения и природа противоопухолевой активности

Первый представитель производных индоло[2,3-а]карбазола, проявляющих противоопухолевую активность – стауроспорин (Рисунок 1) – был выделен из культуры *Streptomyces staurosporeus* еще в 1977 году. В том же году установлено его строение [60].

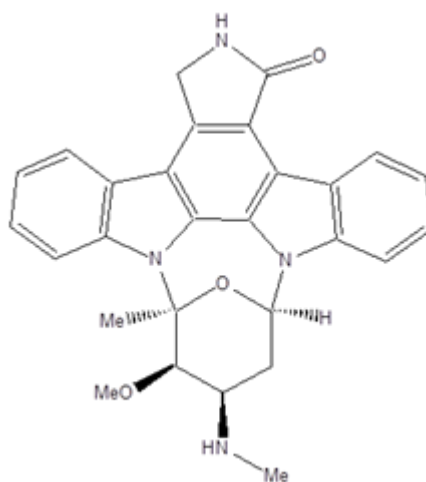


Рисунок 1 – Стауроспорин

Позднее из *Nocardia aerocolonigenes* было выделено второе противоопухолевое соединение из этой группы, получившее название ребеккамицин (Рисунок 2) [72; 93], отличающийся от стауроспорина наличием двух атомов хлора, малеимидной связью и *N*-гликозидной связью с атомом азота, что делает его структуру близкой к нуклеозидам.

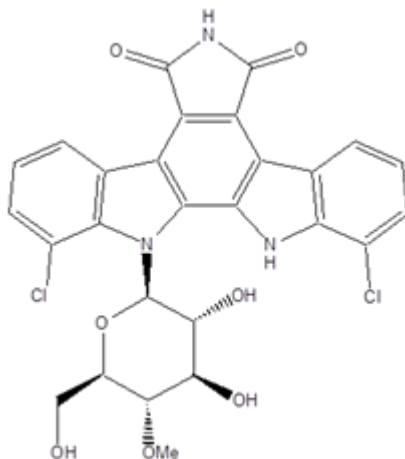


Рисунок 2 – Ребеккамицин

В последующем из ряда микроорганизмов были выделены соединения, близкие стауроспорину и ребеккамицину по структуре [114; 92; 109], также проявившие противоопухолевую активность [85; 118; 62].

Основными мишенями для действия производных индоло[2,3-а]карбазола являются топоизомеразы и протеинкиназы [27; 106; 107], играющие важную роль в процессах репликации, транскрипции, репарации или рекомбинации ДНК [45; 44], что делает их весьма перспективным классом новых противоопухолевых препаратов [14; 18; 36].

Несмотря на то, что в исследованиях *in vitro* производные индолокарбазола показали явные преимущества по сравнению с другими противоопухолевыми препаратами, большим препятствием для их продвижения в практическую онкологию является ограниченная растворимость в воде, например, для ребеккамицина этот показатель составляет менее 10^{-5} г/мл [123].

В связи с этим продолжается активный поиск производных индоло[2,3-а]карбазола, обладающих бóльшей биологической активностью и бóльшей гидрофильностью. Это достигается модификацией структуры соединений при помощи химического синтеза [91; 96] или путем создания лекарственных форм на основе уже имеющихсся соединений с применением солюбилизаторов или липосомальных лекарственных форм [22; 32; 47].

Благодаря многочисленным методам современной органической химии синтетические методы получения производных индоло[2,3-а]карбазола в настоящее время занимают одно из ведущих мест в получении подобных соединений. Основным методом синтеза гетероциклического фрагмента, является конденсация магнийорганических производных индола с *N*-защищенными дигалогенмалеимидами (Рисунок 3) [83].

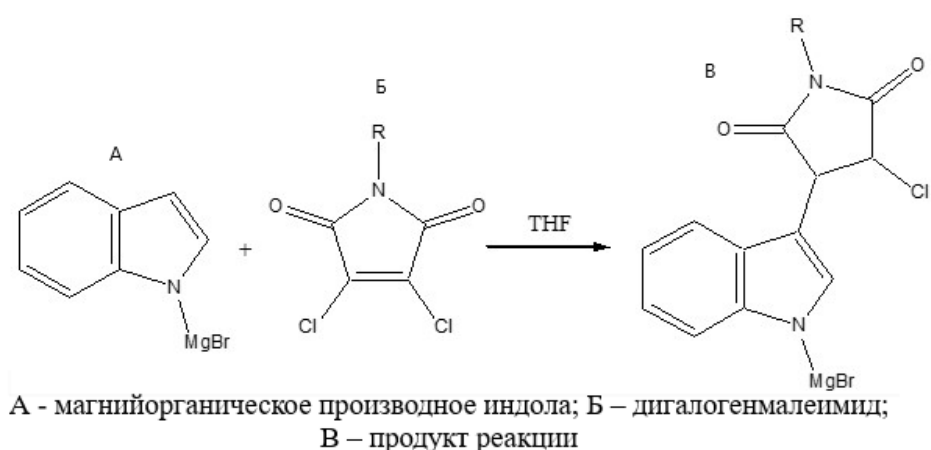
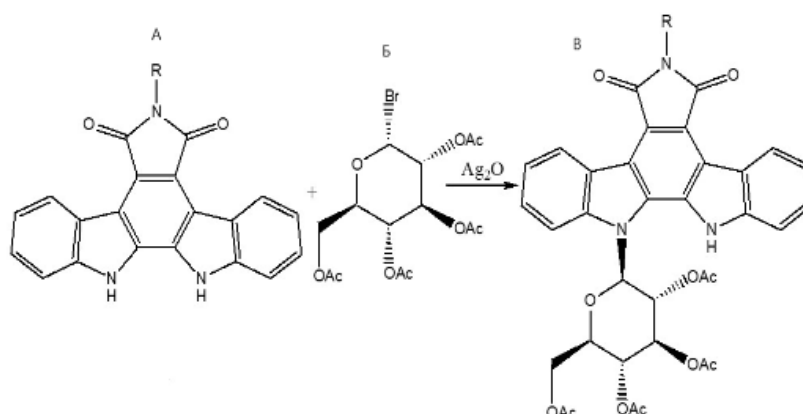


Рисунок 3 - Базовая реакция в синтезе гетероциклического ядра индоло[2,3-а]карбазола

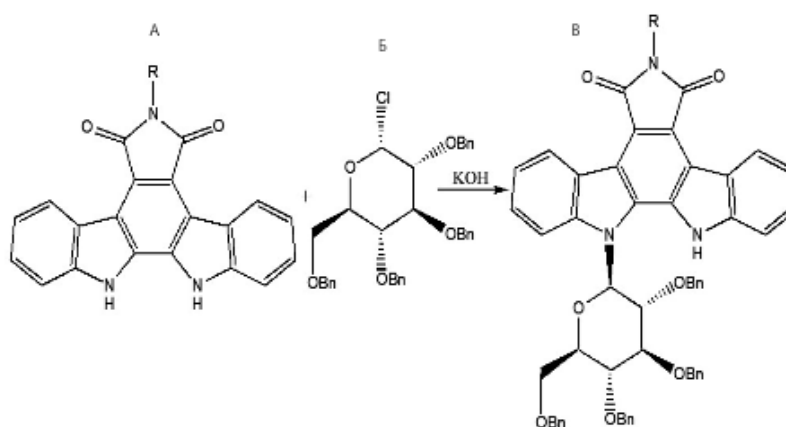
Наибольшее внимание химиков-синтетиков было уделено разработке методов гликозирования полученных гетероциклов с целью дальнейшего получения *N*-гликозидов. Исторически первым подобным методом стало использование ацилгликозилгалогенидов (Рисунок 4) в присутствии таких катализаторов, как оксид или карбонат серебра, бромид или цианид ртути [102]. Однако низкий выход, высокая стоимость и токсичность применяемых катализаторов не позволило масштабировать синтез при экспериментальных наработках субстанции.



А – агликон индолокарбазола; Б – ацилгликозидгалогенид; В – ацетат гликозида индолокарбазола

Рисунок 4 – Пример гликозирования индоло[2,3-а]карбазола с оксидом серебра

Большую эффективность показал метод гликозирования с помощью модифицированного межфазного катализа [9]. В качестве углеводного компонента в данном случае использовали бензиловый эфир углевода, содержащий галоген (Рисунок 5) в присутствии оснований в среде ацетонитрила или ДМФА. Помимо высокого выхода целевого соединения большую важность имела стереоспецифичность, так как продуктом реакции являлся только β -аномерный гликозид.



А – агликон индолокарбазола; Б – бензиловый эфир углевода, содержащий галоген; В – бензиловый эфир β -гликозида индолокарбазола

Рисунок 5 – Пример синтеза *N*-гликозидов индоло[2,3-а]карбазола с использованием межфазного катализа

Третьим методом синтеза *N*-гликозидов индолокарбазолов стало применение реакции Митцунобу (Рисунок 6) [103] при участии органических фосфинов и производных азодикарбоновой кислоты. Данная реакция также идет с высоким выходом, а продукты гликозилирования также, как и в предыдущем примере имеют β -конфигурацию гликозидной связи. Основным недостатком всех вышеописанных методов является сложный и многостадийный синтез защищенного галогенсодержащего углевода, что серьезно усложняет масштабирование синтеза.

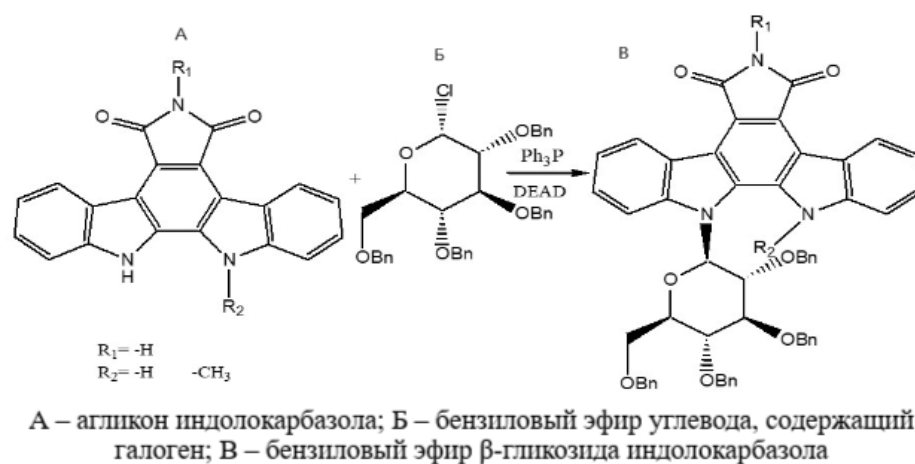


Рисунок 6 – Пример синтеза *N*-гликозидов индоло[2,3-а]карбазола с использованием реакции Митцунобу

В связи с этим группой сотрудников лаборатории химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России был разработан принципиально иной стереоспецифичный метод синтеза гликозидных производных индолокарбазола на основе индолин-индольного метода [46; 63], в дальнейшем, послуживший основой для синтеза ЛХС-1208 и ЛХС-1269. Сущность метода (Рисунок 7) состоит в том, что незащищенный углевод конденсируется с индолином, в котором азот не входит в систему ароматического сопряжения, благодаря чему индолин легко вступает в реакцию гликозилирования [121]. После ацетилирования и дегидрирования продукта гликозилирования индолина получают тетраацетат гликозида индола [42], который конденсируют с оксалилхлоридом, а взаимодействие промежуточного 3-глиоксилилхлорида

индола с индолилуксусной кислотой в присутствии триэтиламина дает *N*-гликозиды бисиндолинфуран-2,5-диона [35]. При облучении ультрафиолетом в присутствии каталитических количеств йода бензольного раствора бисиндолинфуран-2,5-диона получается соответствующий фуранокарбазол, в структуре которого легко заменить кислород азот с нужным радикалом. Защитные группы спиртовых гидроксильных углеводного фрагмента удаляют щелочным гидролизом [26].

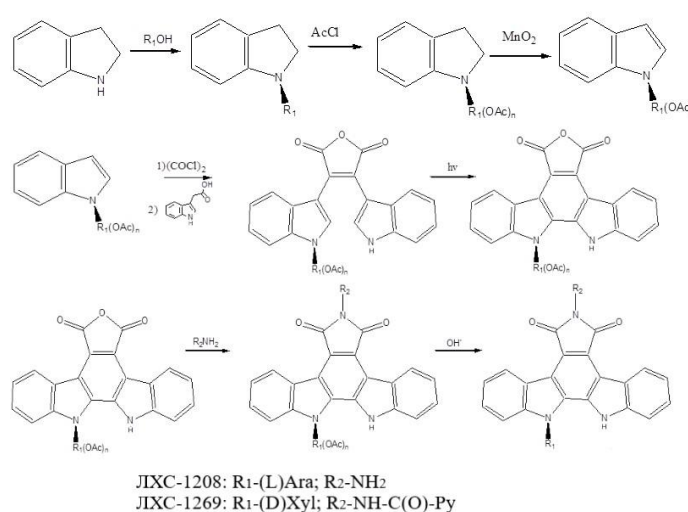


Рисунок 7 - Общая схема синтеза ЛХС-1208 и ЛХС-1269 на основе индолин-индольного метода

1.2 Аналитические методы при исследовании производных индола[2,3-а]карбазола

Для подтверждения структуры, определения чистоты и физико-химических свойств любое впервые полученное физиологически активное соединение должно быть тщательно изучено и охарактеризовано. Для этой цели применяются разнообразные инструментальные методы анализа, большинство из которых описаны в ведущих фармакопеех мира. Изучение специальной литературы, в которой описаны фармакопейные методы анализа природных и синтетических производных индола[2,3-а]карбазола, свидетельствует о том, что для изучения

структуры и оценки чистоты наибольшее распространение получили спектральные (ИК- и УФ-спектрометрия) и хроматографические (ТСХ и ВЭЖХ) методы.

1.2.1 Использование метода ИК-спектрометрии

За счет сравнительно высокой информативности [37] и относительной дешевизны ИК-спектрометрия [112; 120] является одним из основных методов при контроле качества фармацевтических субстанций и используется ведущими фармакопеями мира [10; 71; 82; 119]. К примеру, качественный анализ многочисленных аналогов ребеккамицина методом ИК-спектрометрии в дисках бромида калия показал, что они имеют характерные полосы поглощения в диапазоне от 3450 до 740 см^{-1} . Так, соединение АТ2433-А1, выделенное из *Actinomadura melliaura* [69] (Рисунок 8), имеет полосы пропускания с максимумами при 3425 и 3362 см^{-1} , что указывает на наличие гидроксильных групп в углеводном фрагменте, а ряд максимумов при 768 и 759 см^{-1} свидетельствуют о наличии органически связанного хлора в ароматическом кольце (Рисунок 9) [70].

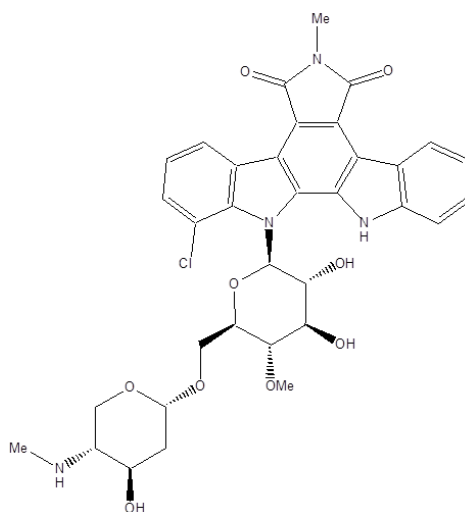


Рисунок 8 – АТ2433-А1

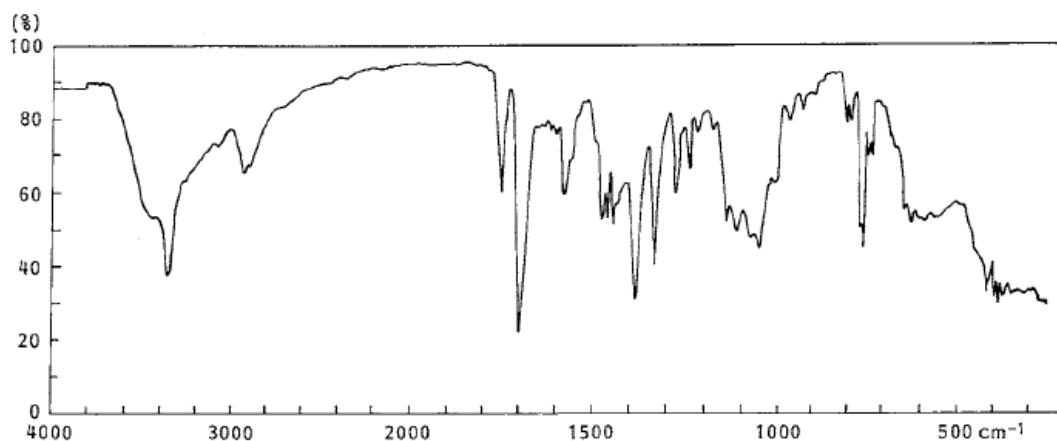


Рисунок 9 – ИК-спектр АТ2433-А1 в КВr [70]

Производное стауроспорина (Рисунок 10), полученное из культуры *Streptomyces longisporoflavus*, характеризуется полосами при 1680 и 1590 cm^{-1} , указывающими на амидную группу, и полоса внеплоскостных деформационных колебаний атомов водорода в ароматическом гетероцикле при 740 cm^{-1} , [84].

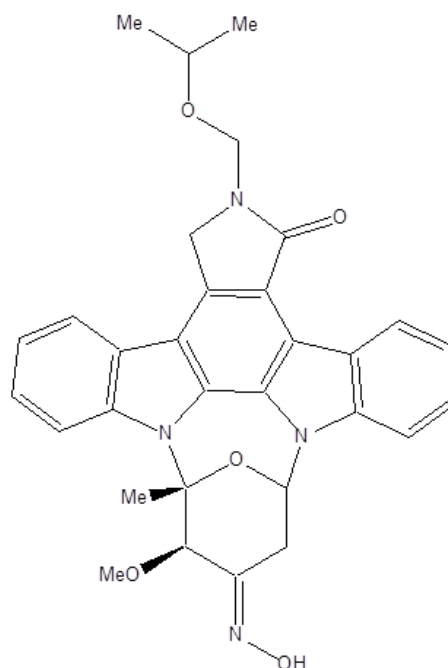
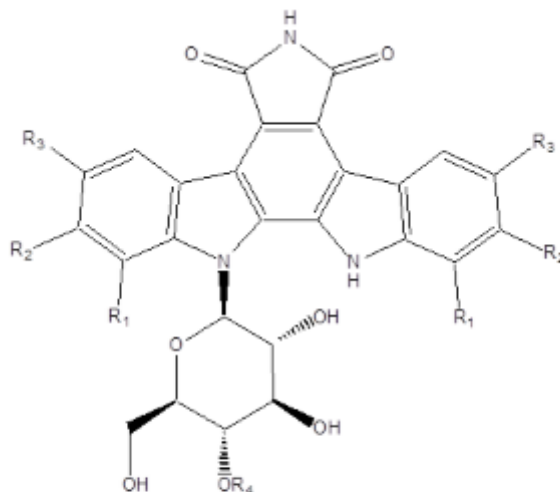


Рисунок 10 – Производное стауроспорина, выделенное из *Streptomyces longisporoflavus*

ИК-спектры ряда фторсодержащих производных ребеккамицина имеют полосы, характерные для фторорганических соединений в диапазоне от 1384-1054 cm^{-1} . Примерами таких соединений являются фториндолокарбазолы А, В и С

(Рисунок 11) с максимумами при 1747 см^{-1} у фториндолкарбазола А, 1745 см^{-1} у фториндолкарбазола В и 1752 см^{-1} для фториндолкарбазола С, которые указывают на наличие $\text{C}=\text{O}$ групп в их структуре. Полосы пропускания в диапазоне $760\text{--}745\text{ см}^{-1}$, принадлежат внеплоскостным деформационным колебаниям атомов водорода [108].



Фториндолкарбазол А: $\text{R}_1\text{ H}$, $\text{R}_2\text{-F}$, $\text{R}_3\text{-H}$,
 $\text{R}_4\text{-Me}$; Фториндолкарбазол В: $\text{R}_1\text{-H}$, $\text{R}_2\text{-F}$,
 $\text{R}_3\text{-H}$, $\text{R}_4\text{-H}$; Фториндолкарбазол С:
 $\text{R}_1\text{-H}$, $\text{R}_2\text{-H}$, $\text{R}_3\text{-F}$, $\text{R}_4\text{-H}$

Рисунок 11 – Фториндолокарбазолы А, В, С

Сотрудниками лаборатории химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» получен ряд синтетических *N*-гликозидов индоло[2,3-а]карбазола, проявивших противоопухолевую активность и ставших первыми представителями серии соединений с лабораторным шифром ЛХС (Рисунок 12). ИК-спектры данных соединений также имели характерные для $\text{C}=\text{O}$ групп максимумы в интервале $1750\text{--}1730\text{ см}^{-1}$ [97].

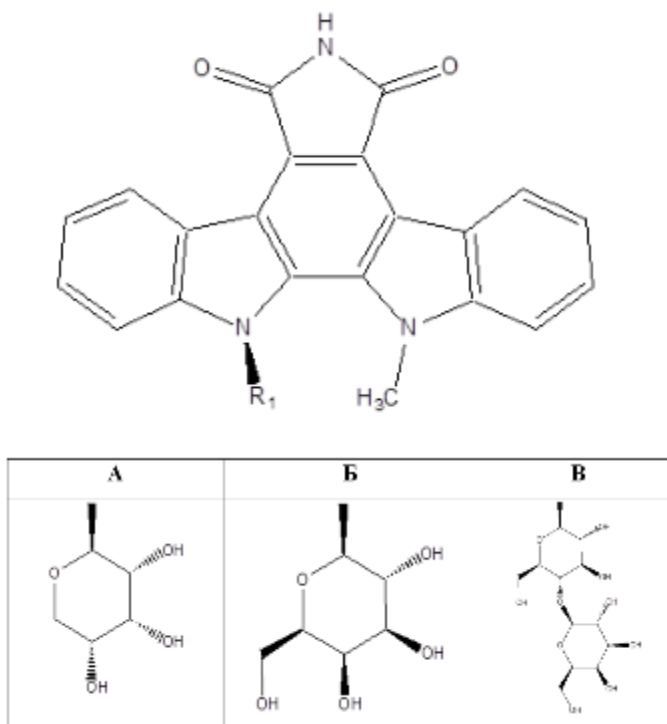


Рисунок 12 – *N*-гликозиды индоло[2,3-а]карбазола из серии ЛХС

1.2.2 Использование метода УФ-спектрофотометрии

Другим широко распространенным фармакопейным методом анализа фармацевтических субстанций является УФ-спектрофотометрия [2; 3]. Наличие в структуре производных индоло[2,3-а]карбазола большого количества сопряженных π -связей позволяет успешно применять метод УФ-спектрофотометрии как для получения характеристических спектров этих соединений, так и для их количественного анализа. Большинство указанных ниже производных имеют характерные максимумы поглощения в диапазоне длин волн от 200 до 500 нм. Так, например, УФ-спектр раствора фториндолокарбазола А (Рисунок 11) в метаноле имеет максимумы поглощения при длинах волн 228, 256, 280, 316 и 398 нм с максимальной экстинкцией около 1050 при волне 316 ± 2 нм [108].

Описанное выше соединение с лабораторным шифром АТ2433-А1 в метаноле демонстрирует максимумы поглощения при длинах волн 200, 235, 283, 316 и 395 нм с максимальной экстинкцией 45562 при 316 нм (Рисунок 13) [70].

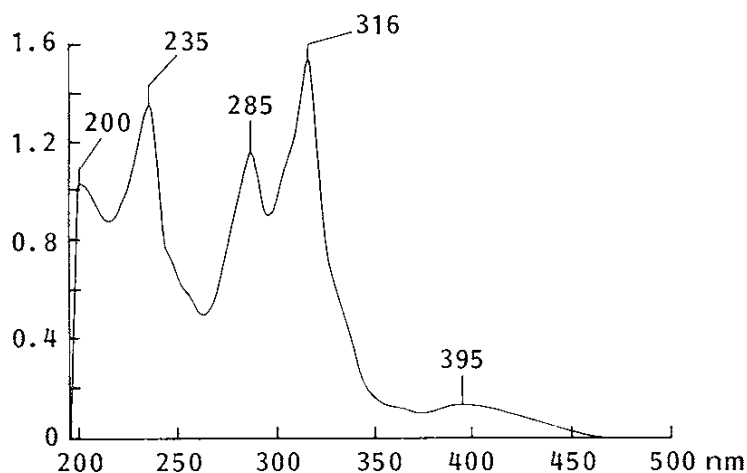


Рисунок 13 – УФ-спектр АТ2433-А1 [70]

1.2.3 Использование метода ВЭЖХ

За счет возможности разделения многокомпонентных смесей и достаточно широкого выбора детекторов метод высокоэффективной жидкостной хроматографии получил широкое распространение, как при выделении, так и определении чистоты новых соединений [38]. Многочисленные работы по синтезу, выделению из природных источников и изучению метаболизма производных индоло[2,3-а]карбазола включают методы ВЭЖХ с использованием разнообразных сорбентов, систем растворителей и детекторов. Большинство описанных методик может быть использовано и для контроля качества фармацевтических субстанций. Например, мидостаурин (Рисунок 14), выделенный из бактерий *Streptomyces staurosporeus*, может быть обнаружен и идентифицирован с использованием флуориметрического детектора при длинах волн 286/386 нм с разделением анализируемого образца на колонке μ Bondapak RP-18 размером 300 x 3,9 мм и размером частиц 10 мкм. В этом случае в качестве подвижной фазы применяли смесь ацетонитрила и 0,001 М раствора ацетата

аммония в воде в соотношении 45:55. Предел обнаружения мидостаурина в таких условиях составил 0,5 нг/мл. Применение колонки RP LiChrospher C-18 размером 125 x 4,0 мм с диаметром частиц сорбента 5 μm с использованием градиентного режима элюирования подвижной фазой, включающей ацетонитрил (ПФ А) и раствор трифторуксусной кислоты в фосфатном буфере (445мкл/л) (ПФ В) при режиме градиента 0-10 минута 40% ПФ А и 60% ПФ Б; 10-20 минута 60% ПФ А и 40% ПФ Б, с последующим удерживанием подобного режима элюирования на протяжении 6 минут и минутным возвращением режиму на 0-10 минуте хроматографирования, позволило понизить предел обнаружения до 0,1 нг/мл мидостаурина в анализе [65; 86].

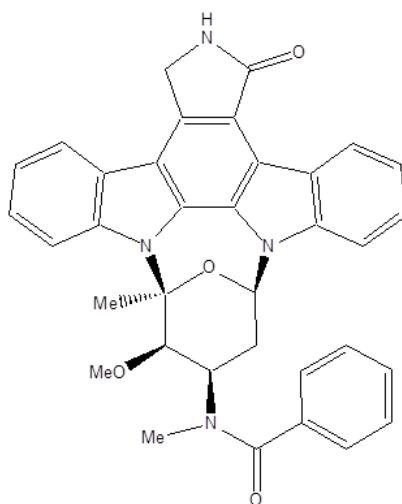


Рисунок 14 – Мидостаурин

Производное стауроспорина, получившее лабораторный шифр UCN-01, определяли с использованием диодно-матричного детектора (длины волн 295 и 323 нм), колонки Nova-Pak Phenyl размером 150 x 3,9 мм (размер частиц 4 мкм), предколонки Nova-Pak C-18 Guard-Pak и ПФ, состоящей из 0,05 М раствора аммония ацетата в воде (ПФ А) и ацетонитрила (ПФ В). Элюирование проводилось в градиентном режиме 0 минута ПФ А 80% ПФ В 20%; 13 – 15 минуты ПФ А 50% ПФ В 50%; 16 минута ПФ А 80% ПФ В 20% при скорости потока 1 мл/мин. Предел обнаружения составил 200 нг/мл [59]. Применение флуориметрического детектора в диапазоне длин волн 310/410 нм и ПФ (0,5 М

раствор аммония ацетата в ацетонитриле и 0,2% водный раствор триэтиламина в соотношении 45:55) в изократическом режиме позволило снизить предел обнаружения до 100 нг/мл [79].

Многочисленные методики препаративной ВЭЖХ, применяемые при выделении и очистке производных индоло[2,3-а]карбазола, после некоторой доработки могут быть успешно применены в качестве потенциальных аналитических методов для контроля качества и стандартизации лекарственных веществ. Подобным примером может служить работа по изучению ряда производных стауроспорина, выделенных из культуры *Streptomyces longisporoflavus* и имеющих общую формулу, представленную на Рисунке 15 [84]. Для разделения экстракта, полученного из биомассы, на отдельные соединения на одной из стадий применяли препаративную ВЭЖХ на колонке Nucleosil C-18 размером 16x250 мм и диаметром зерна сорбента 5 мкм. В качестве ПФ использовали различные системы растворителей в изократическом режиме элюирования. Детектирование проводили с помощью диодно-матричного детектора. Каждое выделяемое соединение имело характерное только для него время удерживания в зависимости от строения, физико-химических свойств и хроматографических условий (Таблица 1).

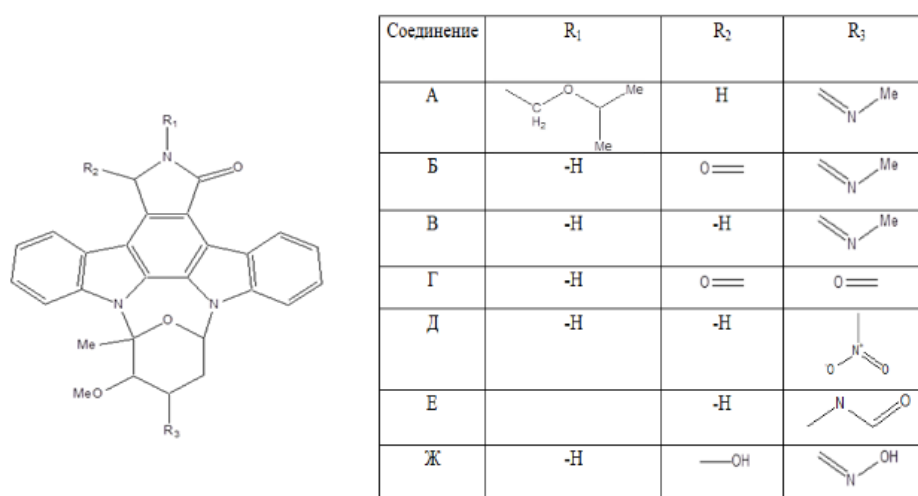


Рисунок 15 – Производные стауроспорина, выделенные из культуры *S. Longisporoflavus*

Таблица 1 – Условия препаративной ВЭЖХ

Соединение	Хроматографические условия (состав ПФ; длина волны)	Время удерживания, мин
А	Вода/ацетонитрил 25:75; 290 нм	13
Б	Вода/ацетонитрил 35:65; 320 нм	7,6
В	Вода/ацетонитрил 40:60; 290 нм	10
Г	Вода/ацетонитрил 25:75; 290 нм	12
Д	Вода/ацетонитрил 25:75	14
Е	Вода:трифторуксусная кислота 100:0,1/вода:ацетонитрил:трифторуксусная кислота 52:48:0,09 (60:40); 290 нм	10
Ж	Вода/ацетонитрил 45:65; 290 нм	7,8

Также из культуры *S. longisporoflavus* было выделено производное индоло[2,3-а]карбазола, не имеющее в своей структуре гликозидного фрагмента (Рисунок 16). Время удерживания данного соединения составляло 9 мин в системе растворителей вода/ацетонитрил 45:65 при длине волны детектора 320 нм.

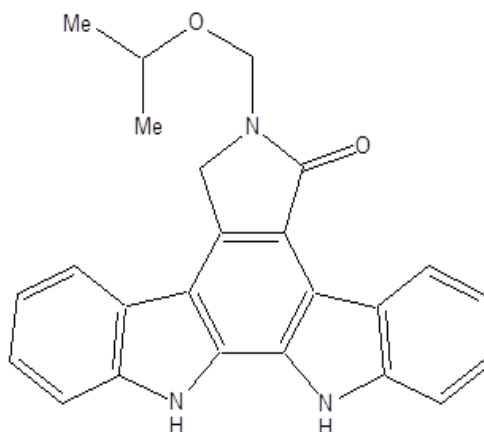
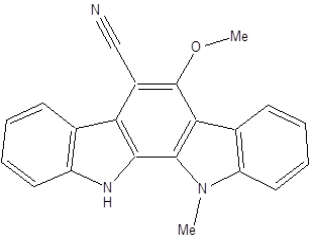
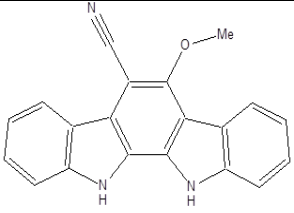


Рисунок 16 – Негликозидное производное индоло[2,3-а]карбазола, выделенное из культуры *S. longisporoflavus*

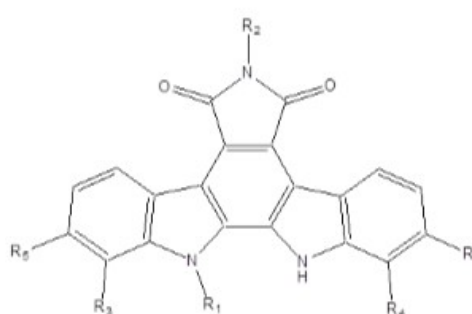
Ряд публикаций посвящен изучению негликозидных предшественников производных ребеккамицина. В Таблице 2 представлены данные, демонстрирующие возможность ВЭЖХ таких соединений как в обращеннофазовом, так и в нормальнофазовом вариантах [78].

Таблица 2 – Хроматографические условия, применяемые при анализе некоторых предшественников индоло[2,3-а]карбазолов методом ВЭЖХ

Структурная формула	Хроматографические условия (колонка, ПФ, скорость подачи элюента)	Время удерживания, мин
	Phenomenex Ultracarb ODS, 10 x 300 мм, 5 мкм; метанол; 2,5 мл/мин	11
	Alltech Econosil Si, 10x250 мм, 10 мкм; тетрагидрофуран /гексан 1:2 + 0,2% воды; 4 мл/мин	14
	Колонка Alltech Econosil Si, 10x250 мм, 10 мкм; тетрагидрофуран/ гексан 1:2 + 0,2% воды; 4 мл/мин	18

Среди работ по получению синтетических производных стауроспорина, с применением ВЭЖХ в качестве метода идентификации полученных веществ, большой интерес вызывает работа по синтезу ряда *N*-алкилированных по атому азота в пирановом фрагменте соединений [81]. Авторы анализировали каждое синтезированное соединение в градиентном режиме с применением колонки Phenomenex Luna C8, размерами 150x4,6 мм и диаметром сорбирующих частиц 5 мкм при скорости потока 1 мл/мин. В качестве ПФ А применяли 0,05% раствор трифторуксусной кислоты в воде. ПФ В состояла из смеси 90% ацетонитрила и 10% 0,05% водного раствора трифторуксусной кислоты. Элюирование проводили в течение 35 минут с применением смеси, содержащей 100% фазы А на 0 минуте и 100% фазы В 35 минуте.

Метод ВЭЖХ также применяли при идентификации ребеккамицина и его производных с общей формулой, изображенной на Рисунке 17.



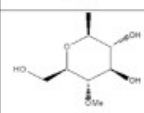
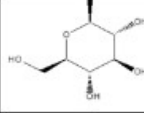
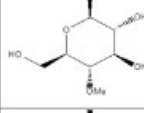
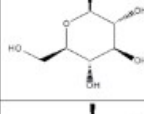
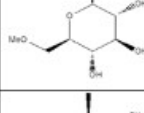
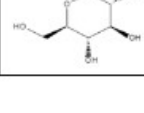
Соединение	R1	R2	R3	R4	R5
А		-H	-Cl	-H	-H
Б		-H	-H	-H	-H
В		-H	-H	-H	-F
Г		-H	-H	-H	-F
Д		-H	-Cl	-Cl	-H
Е		-H	-H	-H	-H

Рисунок 17 – Общая структурная формула производных ребеккамицина, исследованных методом ВЭЖХ

В Таблице 3 указаны хроматографические условия, применяемые при анализе синтезированных соединений и времена их удерживания.

Особенно интересно, что применение методики, описанной в [74], позволяет выявить вещество негликозидной природы со временем удерживания 9,9 мин (Рисунок 18). Это может иметь значение в некоторых случаях контроля качества фармацевтических субстанций, так как подобные соединения могут быть соединениями-предшественниками, которые не удалили из субстанции в процессе ее очистки.

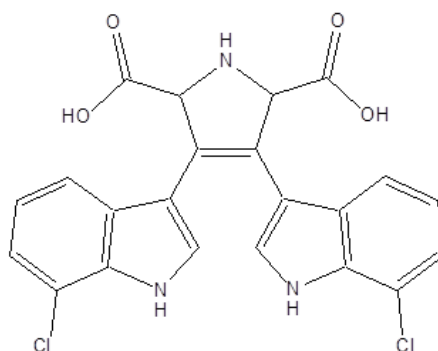


Рисунок 18 – Негликозидный предшественник биосинтеза ребеккамицина

Таблица 3 – Условия и результаты ВЭЖХ некоторых антибиотиков группы ребеккамицина

Соединение	Хроматографические условия (колонка, состав ПФ; длина волны)	Время удерживания, мин	Литература
А	Altex Spherisorb ODS 4,6 ммх25 см, 10 мкм; ацетонитрил/метанол/0,1М водный раствор ацетата аммония 4:3:3; 243 нм	-	[99]
Б	QBX C18;0,1М водный раствор ацетата аммония/метанол/ацетонитрил 4:3:3; 315 нм	-	[101]
В;Г	μBondapak Waters Associates 3,9 x 300 мм; 0,1М водный раствор ацетата аммония/ метанол/ ацетонитрил 4:3:3; 313 нм	В - 11,7; Г - 22,4	[108]
Д; Е	C-18 Rainin Microsorb column 100x4,6 мм, 3мкм; градиентный режим: ацетонитрил (фаза А)/0,15% водный раствор КН ₃ РО ₄ (фаза В); 254 нм	Д - 13,3; Е - 7,9;	[74]

1.2.4 Использование метода ТСХ

За счет высокой селективности и низкой стоимости метод ТСХ успешно применяется как при очистке (препаративная ТСХ), так и при идентификации новых химических соединений [4].

Например, стауроспорин, выделенный из мутантной культуры стрептомицетов SCY114, очищали методом препаративной ТСХ на пластинках, покрытых слоем силикагеля с флуоресцирующей добавкой GF254, толщиной 0,2 мм (Qingdao Haisheng Co., Ltd., Китай). В качестве подвижной фазы применяли систему растворителей хлороформ/метанол (9:1). Вещества обнаруживали в УФ-излучении при длине волны 254 нм [111]. 4'-N-метил-5'-гидроксистауроспорин (Рисунок 19) и 5'-гидроксистауроспорин, (Рисунок 20), выделенные из культуры *Micromonospora sp.*, подвергались качественной оценке

на пластинках с силикагелем фирмы «Merck» с диаметром частиц 40-63 мкм с применением аналогичной системы растворителей. Детектирование проводили в УФ-излучении при длине волны 254 нм или опрыскиванием «ванилиновым реактивом». Значение R_f для 4'-*N*-метил-5'-гидроксистауроспорина составило 0,55 и для 5'-гидроксистауроспорина 0,40. Помимо указанной выше системы растворителей, авторы применяли систему хлороформ/изопропанол (10:1), в которой R_f для 4'-*N*-метил-5'-гидроксистауроспорина и 5'-гидроксистауроспорина составляло 0,35 и 0,25, соответственно [58].

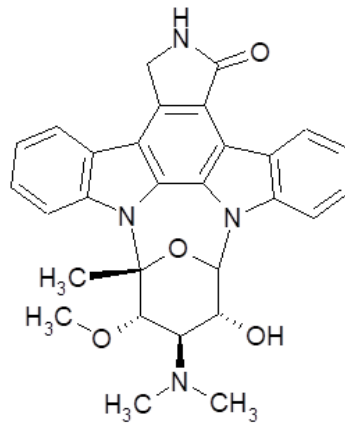


Рисунок 19 – 4'-*N*-метил-5'-гидроксистауроспорин

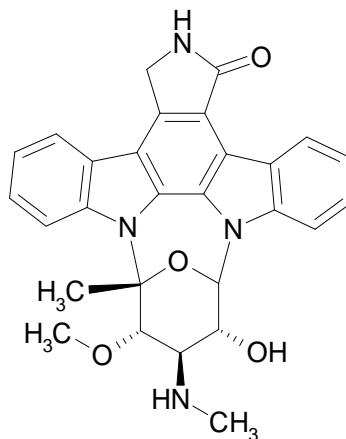


Рисунок 20 – 5'-гидроксистауроспорин

При хроматографировании на силикагеле в системе хлористый метилен-изопропиловый спирт (10:1) с последующим детектированием в УФ-свете при длинах волн 254 нм и 366 нм стауроспорин и

3'-деметокси-3'-гидроксистауроспорин (Рисунок 21) имели значения R_f 0,14 и 0,69, соответственно [57].

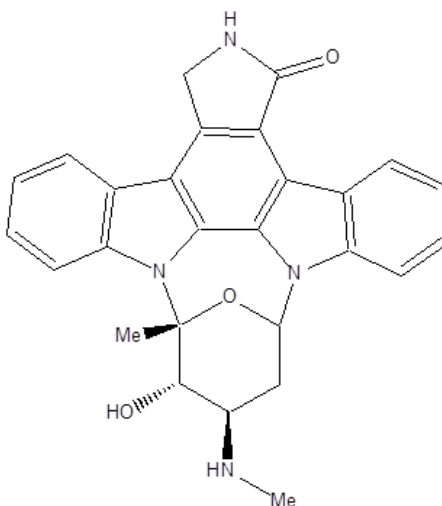


Рисунок 21 – 3'-деметокси-3'-гидроксистауроспорин

Из культур штаммов С-71425 *Nocardioopsis dansonvillei* и С-71799 *Streptomyces sp.*, были выделены и описаны два производных стауроспорина, получившие лабораторные шифры TAN-999 (Рисунок 22А) и TAN-1030А, соответственно (Рисунок 22Б). Для оценки чистоты выделенные соединения подвергали качественному анализу на тонком слое силикагеля F254. В системе растворителей этилацетат-метанол (96:4) R_f для TAN-999 составило 0,11, а для TAN-1030А - 0,61 [117]. При использовании системы хлороформ-метанол (96:4) R_f составило 0,20 и 0,14, соответственно.

Интересно, что стауроспорин при хроматографировании в указанных выше системах растворителей имеет R_f идентичное TAN-1030А. Для того, чтобы отличить TAN-1030А от стауроспорина авторы применили метод ВЭЖХ с использованием колонки ODS, YMC-Pack A-312 (Yamamura Chem. Lab.). В качестве ПФ использовали 55% раствор ацетонитрила в 0,01 М фосфатном буфере (рН 6,3) при скорости потока 2 мл/мин, детектирование проводили на диодно-матричном детекторе при длине волны 254 нм. Время удерживания TAN-1030А и стауроспорина составило 6,0 и 6,3 мин, соответственно.

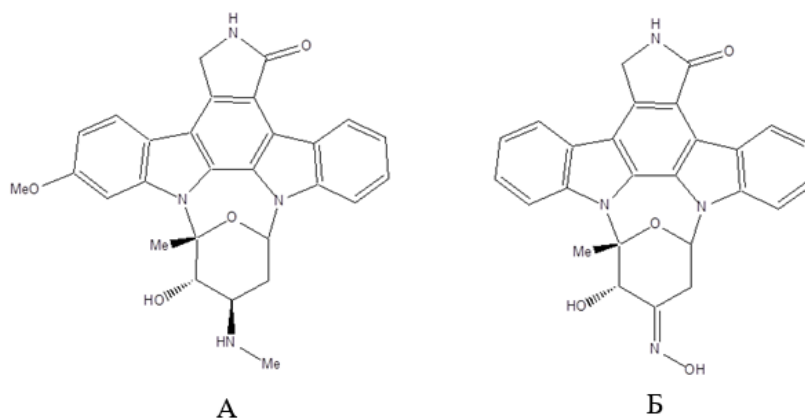


Рисунок 22 – TAN-999- А; TAN-1030-Б

Методом ТСХ исследовали как ребеккамицин, так и его производные. При хроматографировании ребеккамицина на силикагеле R_f составляло 0,75 в тетрагидрофуране и 0,15 в системе хлороформ/метанол (9:1) [101]. Особый интерес вызывают работы [96; 102], в которой описан синтез ряда противоопухолевых *N*-гликозидов индоло[2,3-а]карбазола с фенольными гидроксилами в бензольных кольцах. Синтезированные соединения отличались по радикалу, связанному с малемидной группой. Каждое из вновь полученных соединений хроматографировали на пластинках фирмы Merck с покрытием из силикагеля F254. Производные индолокарбазола, полученные на основе соединения с общей формулой, приведенной на Рисунке 23, подвергали ТСХ в нескольких системах растворителей, приведенных в Таблице 4.

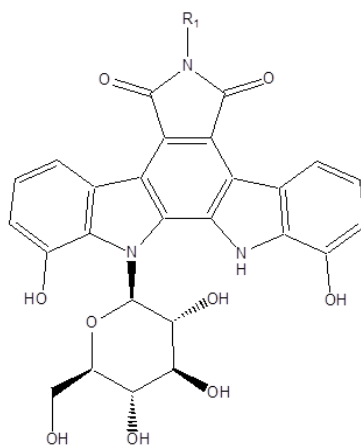
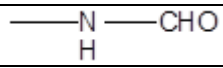
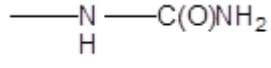
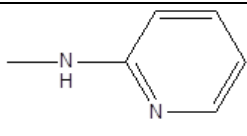
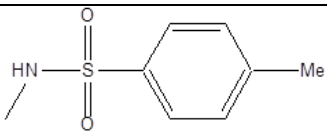
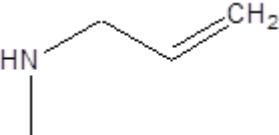
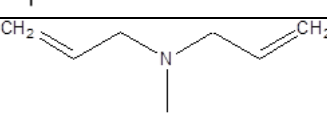
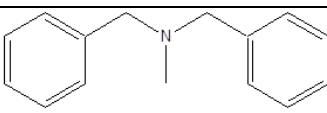
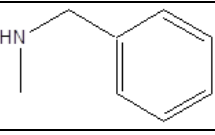
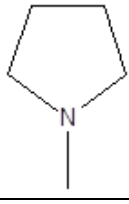
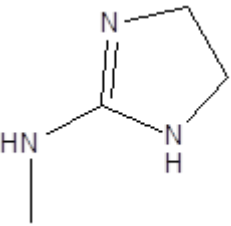
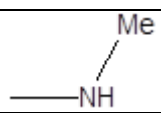
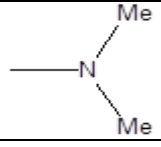


Рисунок 23 – Базовая структура производных индолокарбазола, описанных в работах [96; 102]

Таблица 4 -- Значения R_f для соединений из работ [96; 102]

Радикал	Система растворителей	Значение R_f
-NH ₂	хлороформ-метанол-ТГФ- уксусная кислота (10:1:1:0.2)	0,51
	хлороформ/метанол/ТГФ (2:1:1)	0,35
		0,15
		0,46
	хлороформ/метанол/ТГФ (3:1:1)	0,49
	хлороформ/метанол (2:1)	0,68
		0,75
	хлороформ/метанол (3:1)	0,44
		0,38
	хлороформ/метанол (4:1)	0,3
	н-бутанол/уксусная кислота/вода (4:1:1)	0,55
	хлороформ/метанол/ТГФ /уксусная кислота (20:10:10:1)	0,49
		0,51

Помимо ряда описанных выше соединений, получено соединение, изображенное на Рисунке 24, с иным расположением фенольных гидроксильных групп в бензольных кольцах. В системе хлороформ-метанол-тетрагидрофуран (3:1:1) значение R_f для данного соединения составило 0,22. Для аналога этого соединения, содержащего в качестве гликозидной части не глюкозу, а солянокислую соль 3-амино-3-дезоксиглюкозы (Рисунок 25), значение R_f в системе *n*-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:1) равнялось 0,50.

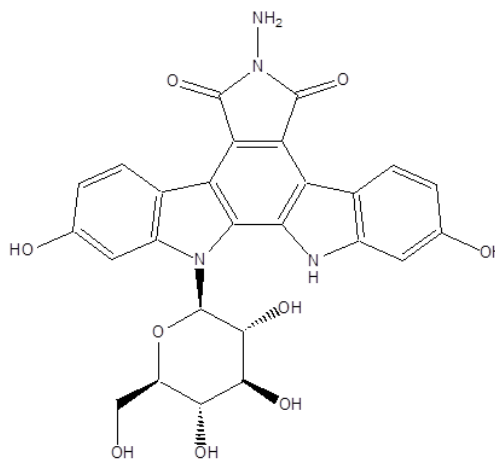


Рисунок 24 – Производное индолакарбазола с иным расположением фенольных гидроксильных групп

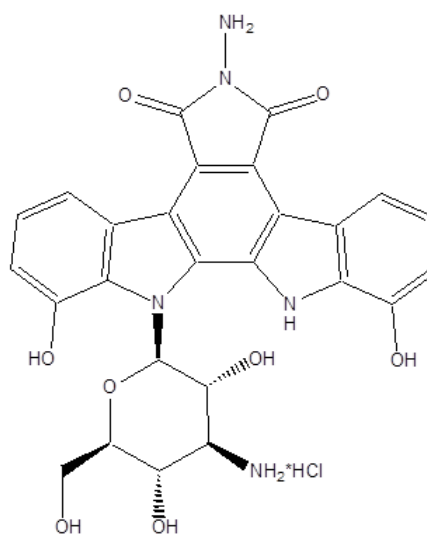


Рисунок 25 – 3-амино-3-дезоксигликозид производного индолакарбазола

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1) Создание современных и безопасных противоопухолевых препаратов сохраняет актуальность для современной российской науки. Среди многочисленных соединений природного и синтетического происхождения с установленной противоопухолевой активностью особый интерес вызывают производные индолокарбазола. Одной из отличительных особенностей механизма действия производных индолокарбазола является их способность взаимодействовать с несколькими мишенями и тем самым инициировать различные пути гибели опухолевых клеток.

2) В настоящее время продолжаются активные работы как по выделению производных индолокарбазола, проявляющих противоопухолевую активность, из природных источников, так и их направленному органическому синтезу для выбора наиболее оптимальных кандидатов на роль будущих противоопухолевых препаратов.

3) Для дальнейшего продвижения этой группы противоопухолевых соединений в практическую онкологию необходимо глубокое исследование их физико-химических свойств, а также разработка и обоснование методик контроля качества.

4) Изученные литературные данные по методам анализа производных индоло[2,3-а]карбазола свидетельствуют о том, что для определения подлинности противоопухолевых препаратов производных индоло[2,3-а]карбазола наиболее часто используются такие методы фармакопейного анализа, как ИК-спектрометрия, УФ-спектрофотометрия. При определении чистоты и количественном анализе производных индоло[2,3-а]карбазола используются методы ТСХ и ВЭЖХ.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты исследования

Объектами диссертационного исследования стали образцы фармацевтических субстанций ЛХС-1208 (Рисунок 26) и ЛХС-1269 (Рисунок 27). Образцы субстанции получены в лаборатории химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России разными сотрудниками в разное время.

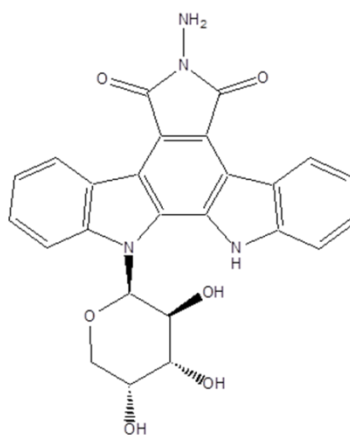


Рисунок 26 – 6-амино-12-(α -L-арабинопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло-[3,4-с]карбазол-5,7-дион (ЛХС-1208)

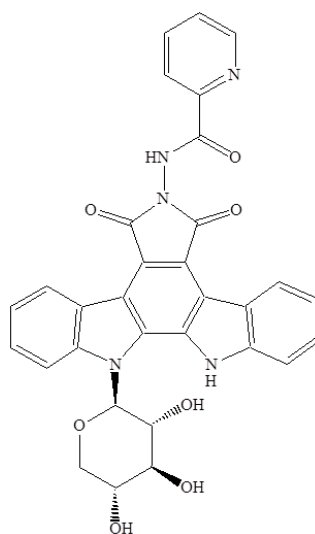


Рисунок 27 – N-[12-(1- β -D-ксилопиранозил)индоло-[2,3-а]пирроло-[3,4-с]карбазол-5,7-дион-6-ил]пиридин-2-карбоксамид (ЛХС-1269)

2.2 Реактивы

В ходе исследования были использованы следующие реактивы:

- азотная кислота ч.д.а. (Химмед, Россия);
- ацетат аммония ч.д.а. (Химмед, Россия);
- ацетонитрил gradient grade для ВЭЖХ (Merck, Германия);
- бромид калия IR grade (Pike technologies, США);
- бромфеноловый синий ч.д.а. (Реахим, Россия);
- бумага фильтровальная марка Ф (Реахим, Россия);
- вода деионизованная типа ASTM-1
- вода очищенная (ФС 2.2.0020.18.);
- гидроксид натрия ч.д.а. (Химмед, Россия);
- ДМСО - d₆ с содержанием дейтерия 99,96 % (Sigma-Aldrich, США);
- ДМСО >99% (Acros organic, Бельгия);
- ДМФА х.ч. (Химмед, Россия);
- дифенилкарбазон ч.д.а. (Химмед, Россия);
- калибровочный раствор “ESI Positive Calibration Solution for the SCIEX X500 System” (AB Sciex Pte. Ltd. Сингапур);
- кислород <99.998% (Химмед, Россия);
- метанол gradient grade для ВЭЖХ (Merck, Германия);
- муравьиная кислота 98+% (Acros organic, Бельгия);
- нитрат свинца (II) ч.д.а. (Химмед, Россия);
- пероксид водорода 33% (Химмед, Россия);
- реактивы для количественного определения воды по методу К. Фишера “Hydranal” (Fluka, Германия);
- ртути (II) нитрат моногидрат х.ч. (Химмед, Россия);
- серная кислота концентрированная (Химмед, Россия);
- сульфид натрия ч.д.а. (Химмед, Россия);

- тетраметилсилан ACS NMR grade $\geq 99,9\%$ (Sigma-Aldrich, США);
- трифторуксусная кислота для ВЭЖХ $\geq 99,0\%$, (Sigma-Aldrich, США);
- этанол 96% (ООО Гиппократ, Россия);
- уксусная кислота ледяная х.ч. (Химмед, Россия).

2.3 Оборудование

В исследованиях использовали сертифицированное аналитическое оборудование:

- автоматический титратор VD-20 (Mettler-Toledo, Швейцария);
- весы аналитические Sartorius 2405 (Sartorius, Германия);
- встряхиватель Vortex (Heidolph, Германия);
- аналитический жидкостный хроматограф Agilent 1200, оснащенный четырехканальным дегазатором G1322A; градиентным четырехканальным насосом G13111A; автосамплером G1367B; термостатом образцов G1330B; термостатом колонок G1316A; диодно-матричным детектором G1315D, под управлением программного обеспечения OpenLAB CDS ChemStation (Ver. B. 03.02-SR1) (Agilent technologies, США);
- жидкостный хроматограф Agilent 1260 Infinity II, оснащенный градиентным четырехканальным насосом со встроенным дегазатором G711B; автосамплером G7129A; термостатом колонок G7116A; диодно-матричным детектором G7117C под управлением программного обеспечения SCIEX OS (Ver. 2.1.6. 59781) (AB Sciex Pte. Ltd. Сингапур);
- инфракрасный спектрометр с преобразованием Фурье Nicolet iS20 под управлением программного обеспечения OMNIC 9 (Ver 9.12.928) (Thermo Fisher Scientific Inc., США);
- масс-спектрометр SCIEX X500R QTOF под управлением программного обеспечения SCIEX OS (Ver. 2.1.6. 59781) (AB Sciex Pte. Ltd. Сингапур);

- микроскоп Zeiss Axio Imager A2, оснащенный лампой видимого света Hal 100, УФ-лампой HBO 100 и камерой Axioscam 506 mono, под управлением программного обеспечения ZEN 3.4 (Ver. 3.4.9.1.00000) (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия);
 - муфельная печь СНОЛ 6/1 (Россия);
 - поляриметр Unipol L (SCHMIDT+HAENICH, Германия);
 - Система для получения особо чистой воды Milli-Q Water Purification System Simplicity UV S Kit (Millipore, США);
 - спектрофотометр Cary-100 под управлением программного обеспечения CaryWinUV (Ver. 3.00) (Varian Inc., США);
 - центрифуга Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Германия)
 - ЯМР спектрометр Bruker WH-500, (Bruker, Германия).
- В качестве вспомогательного оборудования использовали:
- дозаторы 1-канальные с переменным объемом 0,1-10 мкл, 10-100 мкл, 100-1000 мкл TopPette (Intllab, Китай);
 - колонка хроматографическая Poroshell 120 150 mm x 3 mm, EC-C18 2,7 μm (Agilent technologies, США);
 - колонка хроматографическая Zorbax SB-C18 150 mm x 3 mm 5 μm , (Agilent technologies, США);
 - посуда мерная стеклянная лабораторная (ГОСТ 29227-91);
 - предколонка Zorbax 4.6 x 12,5 mm SB-C18 5-Micron, (Agilent technologies, США)
 - пробирки типа Eppendorf, объемом 1,5 мл («Eppendorf», Германия)
 - холодильник фармацевтический Forma FRPH1204V (Thermo Fisher Scientific Inc., США).

2.4 Методы исследования

Исследования субстанций проводили с помощью методов анализа, описанных в ГФ РФ XIV [10] и рекомендаций [33; 34]:

Структуру ЛХС-1208 и ЛХС-1269 подтверждали методами:

- спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ОФС.1.2.1.1.0007.15)
- тандемной масс-спектрометрии (ОФС.1.2.1.1.0008.15),
- спектрометрии в инфракрасной области (ОФС.1.2.1.1.0002.15) и спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой областях (ОФС.1.2.1.1.0003.15).

Определение внешнего вида субстанций проводили согласно требованиям ГФ РФ XIV, ОФС.1.1.0006.15. «Фармацевтические субстанции» и ОФС.1.2.1.0009.15 «Оптическая микроскопия».

Растворимость субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269 проводили в соответствии с требованиями ОФС.1.2.1.0005.15.

Определение удельного вращения субстанций проводили методом поляриметрии (ОФС.1.2.1.0018.15).

Органически связанный хлор определяли методом сжигания в колбе с кислородом (ОФС.1.2.3.0010.15).

Сульфатную золу и тяжелые металлы определяли по методикам ОФС.1.2.2.2.0014.15; ОФС.1.2.2.2.0012.15.

Воду определяли методом титрования по К. Фишеру, согласно требованиям ОФС.1.2.3.0002.15.

Количественное определение и обнаружение примесей проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением методики, разработанной согласно требованиям ОФС.1.2.1.2.0005.15.

Валидацию методик осуществляли в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012.15. и рекомендациями [7; 55].

Статистическую обработку результатов эксперимента проводили с помощью компьютерной программы Excel 2010 (Microsoft Office 2010) [29], согласно требованиям ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» и рекомендациями [12].

ГЛАВА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА И РАЗРАБОТКА МЕТОДИК АНАЛИЗА СУБСТАНЦИИ ЛХС-1208

Важным этапом в процессе создания нового лекарственного средства является тщательное изучение его физико-химических свойств, на основе которых проводится разработка аналитических методик и нормирование показателей качества, как фармацевтической субстанции [10].

3.1 Подтверждение структуры ЛХС-1208 спектральными методами

Применение многочисленных спектральных методов анализа позволяют точно определить и подтвердить структуру впервые синтезированного биологически активного соединения. Для подтверждения структуры ЛХС-1208 применяли такие методы, как ^1H -ЯМР спектроскопия высокого разрешения, ИК-спектроскопия, УФ-спектрофотометрия и тандемная масс-спектрометрия высокого разрешения.

3.1.1 Подтверждение структуры ЛХС-1208 методом ^1H -ЯМР спектрометрии

^1H -ЯМР спектроскопия позволяет указать расположение протонов в молекуле биологически активного соединения, что дает возможность подтвердить его структуру.

^1H -ЯМР спектры ЛХС-1208 записывали на ЯМР-спектрометре высокого разрешения Bruker WH-500 с применением DMSO-d_6 в качестве растворителя и тетраметилсилана в качестве внутреннего стандарта.

У всех изученных образцов субстанции ЛХС-1208 ^1H -ЯМР спектры имели следующие сигналы (δ м.д, J Hz): 12.15 (с, 1H, NH-индол), 9.23 (д, 1H, Ar), 9.14(д, 1H, Ar), 7.94 (д, 1H, Ar), 7.70 (д, 1H, Ar), 7.62 (т, 1H, Ar), 7.59 (т, 1H, Ar), 7.41(т, 1H, Ar), 7.37 (т, 1H, Ar), 6.11(д, 1H, H1', J1'2' 9.1), 6.86, 5.38, 5.24 (3 ушир. с, 3H,

2',3',4'-OH), 4.99 (2H, с, NH₂), 4.20-4.05 (м, 3H, H_{2'}, H_{3'}, H_{5''}), 4,25 (м, 1H, H_{5'}), 3.85 (м, 1H, H_{4'}) (Рисунок 28) [41].

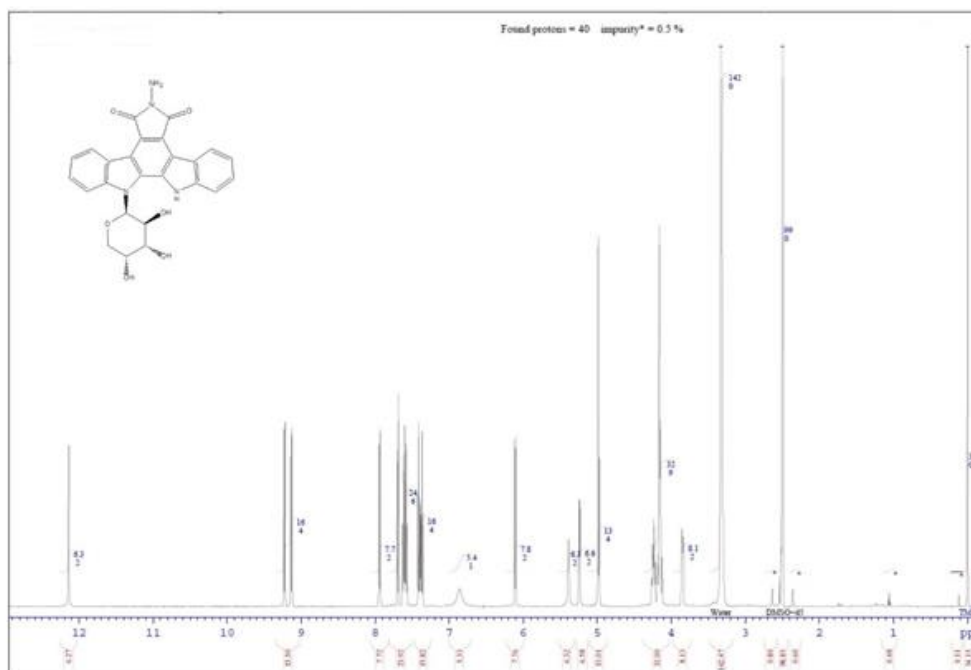


Рисунок 28 – ¹H-ЯМР спектр ЛХС-1208 в ДМСО-d₆

3.1.2 Подтверждение структуры ЛХС-1208 методом ИК-спектроскопии

За счет простоты и относительно низкой стоимости метод ИК-спектроскопии широко применяется при подтверждении структуры органических соединений, так как совокупность всех полос поглощения ИК-спектра определяет индивидуальную структуру исследуемого соединения [10]. ИК-спектры записывали на ИК-Фурье спектрометре Nicolet iS20.

Методика

Около 2 мг ЛХС-1208 растирали в агатовой ступке с 200 мг прокаленного калия бромида и запрессовывали в диски. ИК-спектры записывали в диапазоне от 4000 до 400 см⁻¹ при 32 сканированиях в минуту [1; 41].

В результате проведенных исследований образцов ЛХС-1208 выявлено, что ИК-спектры исследуемых образцов были одинаковы и содержали набор характеристических полос пропускания с максимумами в интервалах частот: 3560; 3432; 3317 см^{-1} (ν ОН, NH, NH₂ as и s), 1758; 1696 см^{-1} (ν C=O as и s), 1576 см^{-1} (ν C_{ar}-C_{ar}), 1475 см^{-1} (δ N-H имидн.), 1396; 1332 см^{-1} (δ C-H при sp³ гибридизации), 1276 см^{-1} (δ O-H, ν C-N имидн.), 1237; 1088 см^{-1} (ν C-OH, ν C-N амин), 788; 741 см^{-1} (δ C-H Ar.) (Рисунок 29) [43].

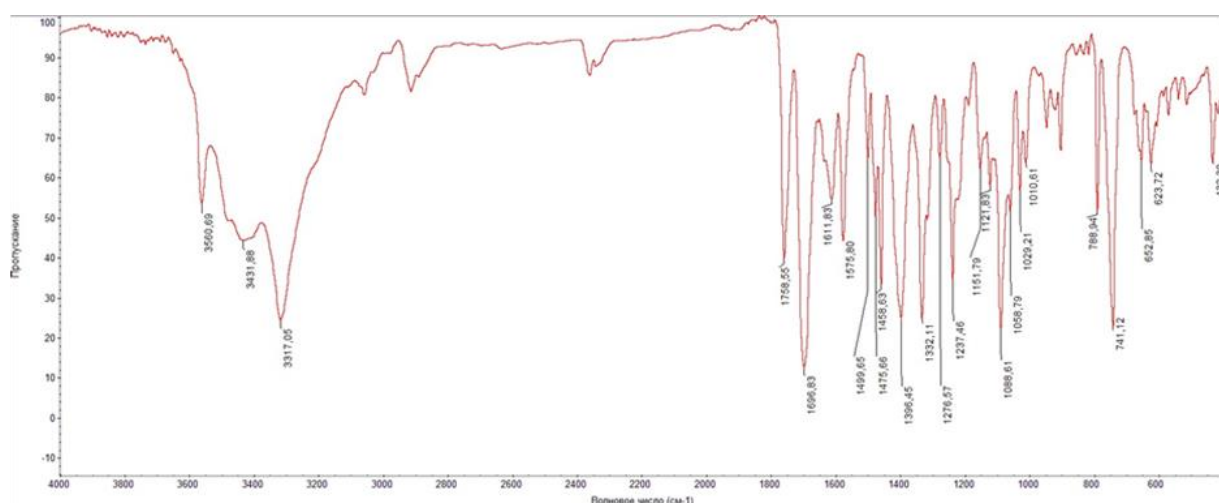


Рисунок 29 – ИК-спектр ЛХС-1208 (2мг в 200 мг KBr)

Проведенные исследования показали, что ИК-спектр ЛХС-1208 имеет ряд специфических полос пропускания и может быть использован для подтверждения подлинности.

3.1.3 Подтверждение структуры ЛХС-1208 методом УФ-спектрофотометрии

УФ-спектры, получаемые в ходе анализа методом УФ-спектрофотометрии, позволяют отразить ароматическую природу исследуемого вещества и получить важную информацию для его количественного анализа. В связи с этим данный метод является одним из наиболее распространенных методов фармакопейного анализа [41; 39].

Электронные спектры поглощения растворов субстанции ЛХС-1208 в ДМФА записывали на спектрофотометре Cary-100.

Методика

Испытуемый раствор. Около 0,0075 г (точная навеска) ЛХС-1208 растворяли в ДМФА в мерной колбе вместимостью 25 мл, доводили объём раствора до метки тем же растворителем и перемешивали. 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили до метки ДМФА и перемешивали.

УФ-спектр полученного раствора записывали в диапазоне от 200 до 500 нм в кювете из кварцевого стекла с толщиной поглощающего слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения ДМФА.

Удельный показатель поглощения рассчитывали по формуле (1):

$$E_{\text{см}}^{1\%} = \frac{A \times 1250}{m \times 100} \quad (1)$$

где: $E_{\text{см}}^{1\%}$ - удельный показатель поглощения

A – значение оптической плотности при $\lambda 320 \pm 2$ нм

m – навеска ЛХС-1208 (г)

В полученных УФ-спектрах ЛХС-1208 присутствуют максимумы при (287 ± 2) нм и (320 ± 2) нм, плечо при (306 ± 2) нм и при (343 ± 2) нм (Рисунок 30). Наиболее интенсивными сигналами являются максимумы при длинах волн 287 и 320 нм. Отношение значений оптической плотности (D_{320}/D_{287}) для изученных образцов составило $1,42 \pm 0,05$.

Удельный показатель поглощения в наиболее интенсивном максимуме поглощения при 320 нм укладывался в пределы от 1024 до 1084 (Таблица 5) [41].

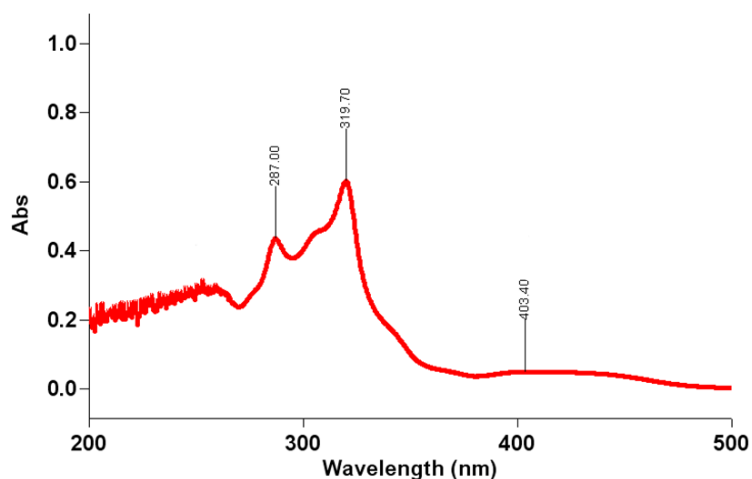


Рисунок 30 –УФ-спектр ЛХС-1208 (0,0006 % раствор в ДМФА)

УФ-спектры лабораторных образцов субстанции, представленных для исследования, совпадали, имели специфический профиль и спектральное отношение, что может быть использовано при определении ее подлинности.

Таблица 5 – Удельный показатель поглощения ЛХС-1208 (0,0006% раствор в ДМФА)

№ образца	Удельный показатель поглощения, $\lambda_{\max} = 320 \text{ нм}^*$	Оптическая плотность при $320 \pm 2 \text{ нм}^*$	Оптическая плотность при $287 \pm 2 \text{ нм}^*$	Соотношение A320/D287*
1	1050	0,655	0,449	1,46
2	1052	0,672	0,467	1,43
3	1040	0,664	0,469	1,42
4	1044	0,675	0,480	1,41
5	1037	0,665	0,469	1,44

*Примечание – среднее значение из шести определений

3.1.4 Подтверждение структуры ЛХС-1208 методом tandemной масс-спектрометрии высокого разрешения

Метод tandemной масс-спектрометрии высокого разрешения позволяет с высокой точностью определить молекулярную массу и тем самым подтвердить элементный состав и строение исследуемого соединения [50].

Методика

Смесь растворителей ДМСО-ацетонитрил (1:9). К 90 мл ацетонитрила прибавляли 10 мл ДМСО, перемешивали.

Смесь деионизованной воды, ацетонитрила и муравьиной кислоты (1:9:0,1). К 90 мл ацетонитрила прибавляли 10 мл деионизованной воды и 0,1 мл муравьиной кислоты, перемешивали.

Испытуемый раствор. Около 10 мг ЛХС-1208 (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл и растворяли в смеси растворителей ДМСО-ацетонитрил (1:9), доводили тем же растворителем до метки и перемешивали. 10 мкл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводили объем до метки смесью деионизованной воды, ацетонитрила и муравьиной кислоты (1:9:0,1).

Масс-спектры высокого разрешения записывали на тандемном масс-спектрометре SCIEX X500R QTOF в IDA-режиме.

1 мл раствора вводили в источник ионов со скоростью подачи 0,6 мл/ч.

Общее время сканирования составило 23 мин, время одного сканирования – 0,346 с, при общем числе сканирований 3993. Ионизацию производили методом “электроспрей” под напряжением ионизации +5500 V при давлении азота на распылителе и газа для десольватации в 55 psi. Температура в камере ионизации – 450 °C. Давление газовой завесы входной ионной оптики составляло 25 psi.

Регистрацию ионов проводили в диапазоне от 50 до 800 Да. Порог выбора ионов-прекурсоров по интенсивности составлял более 2500 ионов в секунду при потенциале диссоциации ионов-прекурсоров 80 V и энергии соударения от 30 до 15 V. Давление азота в ячейке соударительной диссоциации составляло 7psi.

На полученных IDA графиках полного ионного потока обнаруживали МСМС-спектры ионов-прекурсоров, соответствующих массе молекулы ЛХС-1208 с дополнительным присоединенным протоном.

Масса протонированного иона-прекурсора $m/z [M+H^+]$ – 473,1482 Да при вычитании массы одного протона полностью соответствовала массе молекулы

ЛХС-1208, рассчитанной по её брутто-формуле – $C_{25}H_{20}N_4O_6$, равной 472,1382 Да. МСМС-спектры ионов-прекурсоров всех образцов фармацевтической субстанции ЛХС-1208 были одинаковы (Рисунок 31).

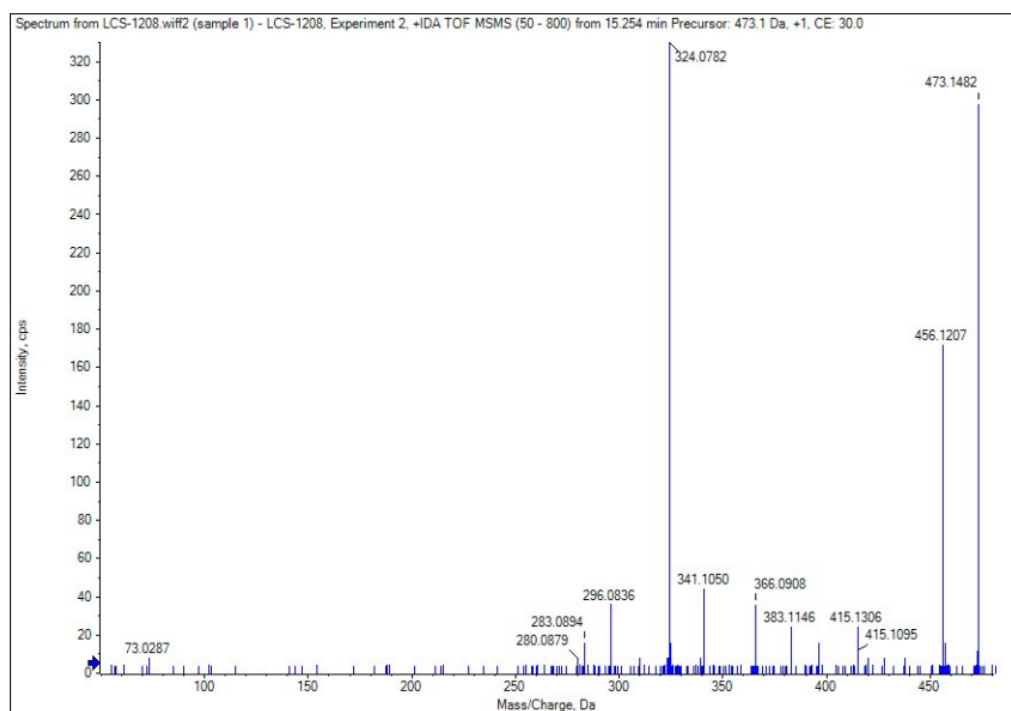


Рисунок 31 – МСМС-спектр $[M+H^+]$ ЛХС-1208

3.2 Определение физико-химических свойств ЛХС-1208

3.2.1 Характеристика внешнего вида

При рассмотрении невооруженным глазом все исследуемые образцы лабораторных серий субстанции ЛХС-1208 представляли собой аморфный порошок оранжевого цвета. Запаха исследуемые образцы не имели [41; 39].

Дополнительно проведено исследование внешнего вида лабораторных образцов ЛХС-1208 методом оптической УФ-микроскопии с использованием микроскопа Zeiss Axio Imager A2.

Образцы субстанции ЛХС-1208 при десятикратном увеличении в УФ-свете представляли собой мелкокристаллический порошок оранжевого цвета (Рисунок 32).

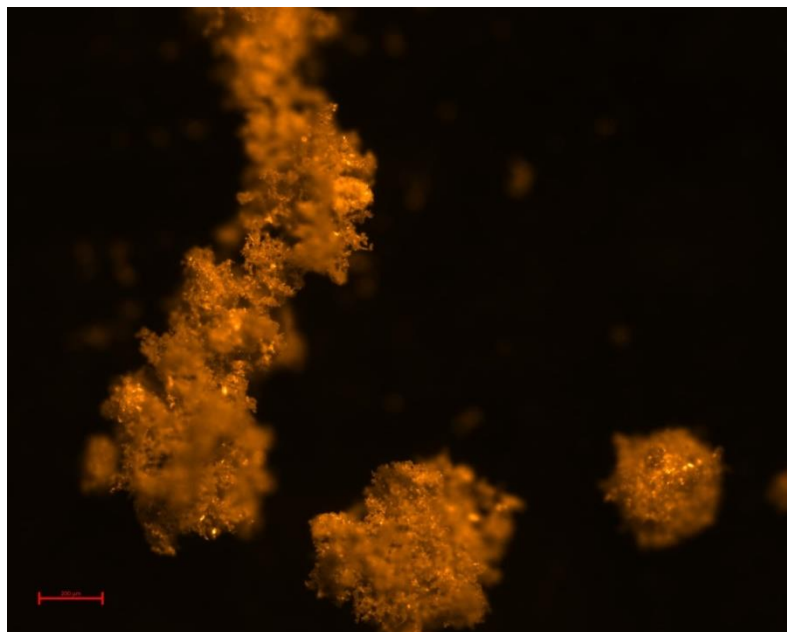


Рисунок 32 – Микрофотография образца фармацевтической субстанции ЛХС-1208 (X10)

3.2.2 Определение растворимости

Все изученные образцы фармацевтической субстанции ЛХС-1208 были растворимы в ДМСО (1:20), умеренно растворимы в ДМФА (1:40), очень мало растворимы в 95 % этаноле (1:9000) и практически нерастворимы в воде (>1:10000).

Растворы ЛХС-1208 в ДМСО и ДМФА с концентрацией 0,6– 0,006 % имели оранжевый цвет и были прозрачными [41; 39].

3.2.3 Определение удельного вращения

Так как ЛХС-1208 содержит в своей структуре углеводный фрагмент, его молекула способна отклонять плоско поляризованный свет при анализе методом поляриметрии.

Методика

Около 0,25 г субстанции (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 10 мл ДМФА и перемешивали до полного растворения. Полученный раствор доводили ДМФА до метки.

Показатель удельного вращения определяли на поляриметре Unipol L в кювете длиной 10 см с использованием ДМФА в качестве образца сравнения.

В Таблице 6 приведены значения удельного оптического вращения для изученных образцов субстанции ЛХС-1208 [41; 39].

Таблица 6 – Результаты определения удельного вращения образцов субстанции ЛХС-1208 (1% раствор в ДМФА)

№ образца	Удельное вращение*
1	+61°
2	+60°
3	+59°
4	+58°
5	+59°

*Примечание – среднее значение из шести определений

Проведенные исследования показали, что значение удельного угла вращения, для субстанции ЛХС-1208 составляет от +58° до +61°.

3.2.4 Определение органически связанного хлора

Так как в процессе синтеза ЛХС-1208 применяли хлорорганические реагенты [63], для образцов лабораторных серий фармацевтических субстанции проведено определение содержания органически связанного хлора методом сжигания в колбе с кислородом (по Шёнигеру) в соответствии с ОФС.1.2.3.0010.15.

Во всех исследуемых образцах субстанции органически связанного хлора не обнаружено [41; 39].

3.2.5 Определение сульфатной золы и тяжелых металлов

Для исследуемых образцов фармацевтической субстанции ЛХС-1208 проведены исследования на допустимые содержания сульфатной золы и тяжелых

металлов согласно ОФС.1.2.2.2.0014.15 и ОФС.1.2.2.2.0012.15. В качестве реактива при определении содержания тяжелых металлов использовали сульфид натрия.

Для всех исследованных образцов ЛХС-1208 сульфатная зола из 0,5 г субстанции (точная навеска) не превышала 0,05%. Также все образцы выдерживали испытания на тяжелые металлы, так как их содержание не превышало 0,001%.

Полученные в ходе исследования данные полностью соответствуют требованиям ГФ РФ XIV.

3.2.6 Определение содержания воды

Определение содержания воды в ЛХС-1208 проводили методом титрования по К. Фишеру, в соответствии с требованиями ОФС.1.2.3.0002.15. Определение проводили на автоматическом титраторе Mettler-Toledo VD-20, с применением набора реактивов для количественного определения воды по методу К. Фишера, используя точные навески субстанции около 0,05 г. Результаты исследования приведены в Таблице 7.

Таблица 7 – Содержание воды в образцах субстанции ЛХС-1208

№ образца	Содержание воды, %*
1	0,36
2	0,58
3	0,70
4	0,72
5	0,68

*Примечание – среднее значение из шести определений

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в испытуемых образцах ЛХС-1208 присутствует вода в виде гигроскопической влаги, но её содержание не превышает 1,00 % [41; 39].

3.3 Определение примесей и количественного содержания действующего вещества в фармацевтической субстанции ЛХС-1208

Одним из основных этапов исследования новых биологически активных соединений при определении норм качества является разработка количественного определения действующего вещества и обнаружения возможных примесей.

В настоящее время метод ВЭЖХ имеет широкое распространение в фармацевтическом анализе. При применении различных детекторов совмещенных с ВЭЖХ-анализом возможно установить как подлинность анализируемого вещества и его количественное содержание в исследуемом образце, так и наличие возможных примесей [38].

Количественный анализ субстанции ЛХС-1208 проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1200 с диодно-матричным детектором при градиентном режиме элюирования.

Методика

Растворитель. К 90 мл ацетонитрила в мерной колбе вместимостью 100 мл прибавляли 10 мл ДМСО, перемешивали.

Подвижная фаза А. К 900 мл деионизованной воды прибавляли 100 мл ацетонитрила и 1 мл трифторуксусной кислоты, перемешивали.

Подвижная фаза Б. К 750 мл ацетонитрила прибавляли 250 мл деионизованной воды и 1 мл трифторуксусной кислоты, перемешивали.

Испытуемый раствор.

Около 0,025 г (точная навеска) ЛХС-1208 помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 10 мл смеси ДМСО-ацетонитрил (1:9 по объёму), доводили тем же растворителем до метки и перемешивали. 5 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили до метки подвижной фазой А и перемешивали. Раствор использовали свежеприготовленным.

Хроматографические условия, примененные в методике, приведены в Таблице 8.

Таблица 8 – Хроматографические условия для количественного анализа субстанции ЛХС-1208

ПФ А	Вода - ацетонитрил - трифторуксусная кислота 900:100:0,1	
ПФ Б	Ацетонитрил - вода - трифторуксусная кислота 750:250:0,1	
Колонка	Zorbax SB-C18 длиной 150 мм диаметром 3 мм диаметр зерна сорбента – 5 мкм	
Градиент		
Время, мин	ПФ А %	ПФ Б %
0	100	0
15,0–17,0	0	100
17	Остановка метода	
Объем вводимой пробы, мкл	5	
Скорость потока, мл/мин	0,6	
Температура колонки, °С	40	
Длина волны детектора, нм	315±5	

Расчет содержания действующего вещества и примесей в анализируемых образцах проводили методом внутренней нормализации по формуле (2):

$$X = \frac{S_i}{\sum S_1 + S_2 + \dots + S_i} \times 100\% \quad (2)$$

где S_i – площадь любого единичного пика на хроматограмме испытуемого раствора;

$S_1 + S_2 + \dots + S_i$ – суммарная площадь пиков на хроматограмме.

На хроматограмме исследуемых лабораторных образцов (Рисунок 33) наблюдали основной пик действующего вещества со временем удерживания 12,00-12,20 мин и четыре малоинтенсивных пика примесей неустановленного строения со временем удерживания (RT) 13,36; 14,55, 15,85 и 16,26.

Коэффициент разрешения между пиком примеси с RT около 15,85 мин и пиком ЛХС-1208 составлял не менее 2,5, а между пиком примеси с RT около 16,26 и пиком ЛХС-1208 значение коэффициента разрешения составил не менее 4. Полученные данные свидетельствуют о пригодности хроматографической системы для количественного анализа субстанции ЛХС-1208.

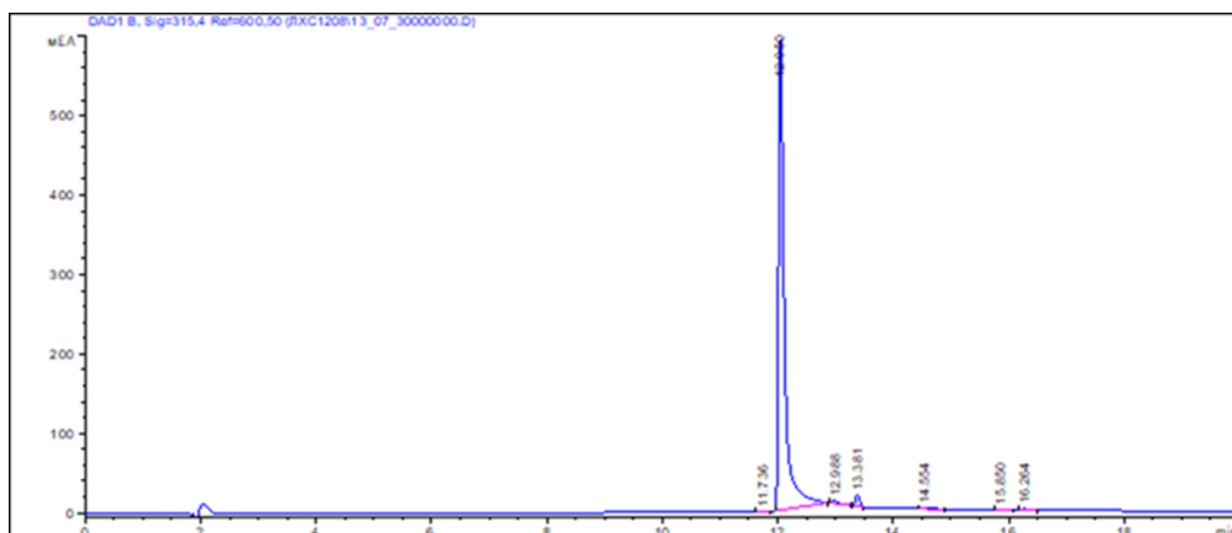


Рисунок 33 – Хроматограмма ЛХС-1208

Результаты ВЭЖХ показали, что содержание действующего вещества в образцах субстанции составляло не менее 97,00 % (Таблица 9), содержание каждой единичной примеси в образцах не превышало 1,0 %, а общая сумма примесей 3,00 % [41; 39].

Таблица 9 – Содержание действующего вещества в ЛХС-1208

№ образца	Содержание действующего вещества, % *	Содержание примесей, % *
1	97,90	2,10
2	99,65	0,35
3	97,35	2,65
4	97,81	2,19
5	97,23	2,77

*Примечание – среднее значение из шести определений

3.4 Разработка проекта спецификации качества для фармацевтической субстанции ЛХС-1208

Основываясь на показателях, полученных в ходе изучения образцов субстанции ЛХС-1208, составили проект спецификации на фармацевтическую субстанцию ЛХС-1208 с применением наиболее распространенных методов фармакопейного анализа (Таблица 10).

Таблица 10 – Проект спецификации на фармацевтическую субстанцию ЛХС-1208

ПОКАЗАТЕЛИ	МЕТОДЫ	НОРМЫ
Описание	Визуальный	Аморфный порошок оранжевого цвета, без запаха
Растворимость	ГФ XIV	Растворим в ДМСО; умеренно растворим в ДМФА; очень мало растворим в спирте этиловом 96 %, практически нерастворим в воде
Подлинность	Спектрофотометрия	УФ-спектр 0,0006 % раствора ЛХС-1208 в ДМФА в области от 200 до 500 нм должен иметь максимумы поглощения при 287±2 нм, 320±2 нм, слабо интенсивный максимум при 400±2 нм; плечо при 306±2 нм и 343±2 нм и минимумы при 271±2 нм, 293±2 нм и 381±2 нм.
	ИК-спектрометрия	ИК-спектр ЛХС-1208 в области от 4000 до 400 см ⁻¹ должен иметь полное совпадение полос поглощения с рисунком ИК-спектра из НД
	ВЭЖХ	Время удерживания пика ЛХС-1208 должно быть 12,00-12,20 мин.
Удельный показатель поглощения	ГФ XIV	От 1024 до 1084 в пересчете на сухое вещество (ДМФА, 320±2 нм)
Удельное вращение	ГФ XIV	От +58 до + 61 °
Прозрачность раствора	ГФ XIV	Раствор 0,006 г ЛХС-1208 в 100 мл ДМФА должен быть прозрачным
Посторонние примеси	ВЭЖХ	Любая единичная неидентифицированная примесь – не более 1,00 %; сумма примесей – не более 3,00 %
Сульфатная зола и тяжелые металлы	ГФ XIV	Сульфатная зола - не более 0,1 %; тяжелые металлы - не более 0,001 %
Количественное определение	ВЭЖХ	Не менее 97,00 %
Микробиологическая чистота	ГФ XIV	Категория 1.2 Б
Упаковка	По 100 или 200 г в банках оранжевого стекла с навинчиваемыми пластмассовыми крышкой и прокладками из полиэтилена. На банки наклеивают этикетки. Банки обертывают бумагой мешочной, обвязывают нитками, наклеивают такую же этикетку, после чего помещают в пакеты полиэтиленовые и запаивают.	
Маркировка	В соответствии с НД	
Назначение	Для приготовления инъекционных лекарственных форм	

3.5 Определение сроков годности фармацевтической субстанции ЛХС-1208

Исследование стабильности субстанции ЛХС-1208 проводили при хранении образцов субстанций в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°C (в холодильной камере). Образцы хранили в банках из оранжевого стекла, укупоренных навинчиваемыми пластиковыми крышками. Контроль качества проводили по критериям, указанным в Таблице 11.

На основе полученных данных установлено, что при хранении образцов субстанции ЛХС-1208 в течение 2,5 лет в указанных выше условиях значимых изменений качества субстанции не происходит. Это позволяет установить для данной фармацевтической субстанции срок годности в 2 года [41; 39].

Таблица 11 – Результаты исследования стабильности для субстанции ЛХС-1208

Образец	Описание	Растворимость	Прозрачность раствора	Удельное вращение, °	Вода, %	Удельный показатель поглощения	Количественное определение, %	Примеси %	Срок хранения
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
НОРМЫ	Аморфный порошок оранжевого цвета, без запаха	ДМСО (1: 20); ДМФА (1: 40); спирт этиловый 96 % (1 : 9000), вода (более 1: 10000)	1 % р-ры в ДМФА и ДМСО прозрачны	От +58° до +61°	Не более 1%	λ_{\max} 320 нм 1050±30	Не менее 97,00 %	Сумма примесей – не более 3,0 %	
1	-«-	-«-	-«-	+61	0,36	1050	97,90	2,10	Входной контроль
	-«-	-«-	-«-	+60	0,40	1048	98,70	1,30	3 месяца
	-«-	-«-	-«-	+60	0,42	1052	98,79	1,21	6 месяцев
	-«-	-«-	-«-	+60	0,45	1050	98,83	1,17	9 месяцев
	-«-	-«-	-«-	+61	0,51	1049	98,38	1,62	1 год
	-«-	-«-	-«-	+61	0,54	1051	98,71	1,29	1,5 года
	-«-	-«-	-«-	+60	0,59	1054	98,88	1,12	2 года
	-«-	-«-	-«-	+60	0,62	1049	98,74	1,26	2,5 года

Продолжение Таблицы 11

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2	-«-	-«-	-«-	+60	0,58	1052	99,65	0,35	Входной контроль
	-«-	-«-	-«-	+60	0,75	1056	99,33	0,67	3 месяца
	-«-	-«-	-«-	+60	0,83	1051	99,37	0,63	6 месяцев
	-«-	-«-	-«-	+60	0,9	1049	99,34	0,66	9 месяцев
	-«-	-«-	-«-	+59	0,91	1047	99,41	0,59	1 год
	-«-	-«-	-«-	+60	1,15	1045	99,38	0,62	1,5 года
	-«-	-«-	-«-	+59	1,14	1042	99,30	0,70	2 года
	-«-	-«-	-«-	+60	1,28	1039	99,33	0,67	2,5 года

Продолжение Таблицы 11

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
3	-«-	-«-	-«-	+59	0,70	1040	97,35	2,65	Входной контроль
	-«-	-«-	-«-	+59	0,85	1042	97,42	2,58	3 месяца
	-«-	-«-	-«-	+60	0,98	1040	97,33	2,67	6 месяцев
	-«-	-«-	-«-	+60	1,10	1041	97,35	0,65	9 месяцев
	-«-	-«-	-«-	+60	1,30	1038	97,37	2,63	1 год
	-«-	-«-	-«-	+60	1,35	1045	97,40	2,60	1,5 года
	-«-	-«-	-«-	+60	1,38	1039	97,32	2,68	2 года
	-«-	-«-	-«-	+60	1,38	1040	97,41	2,59	2,5 года

3.6 Разработка методики определения ЛХС-1208 в биологических жидкостях для изучения доклинической фармакокинетики

За счет возможности разделения смесей со сложным составом метод ВЭЖХ нашел широкое применение в фармакокинетических исследованиях [19]. Основной задачей проведенного исследования было подтверждение возможности применения разработанной ранее методики количественного ВЭЖХ анализа для количественного определения ЛХС-1208 в биологических жидкостях (кровь, моча) при изучении фармакокинетики. Кроме того, необходимо разработать методику пробоподготовки для выделения ЛХС-1208 из биологических жидкостей и уменьшения влияния матричного эффекта, искажающего результаты анализа.

Методику выделения ЛХС-1208 из биологических жидкостей разрабатывали на образцах плазмы крови и мочи мышей, к которым добавляли известное количество ЛХС-1208.

В качестве оптимальной методики пробоподготовки рассматривали наиболее простой и удобный вариант выделения ЛХС-1208 из биологических жидкостей путем осаждения белков с последующим центрифугированием образца и отделением супернатанта для анализа. Для этого изучали возможность применения смесей ДМСО:метанол; ДМСО:ацетонитрил; метанол; ацетонитрил и смесь метанол:ацетонитрил (смеси готовили 1:1 по объему). Определяющими факторами для выбора служили вид супернатанта после центрифугирования и площадь пика ЛХС-1208 на полученной хроматограмме (Таблица 12).

Таблица 12 – Зависимость площади пика от выбранного для пробоподготовки растворителя

Образец плазмы	Растворитель	Вид супернатанта	Площадь пика
1	DMCO:MeOH	Мутный, опалесцирует	526,584
2	DMCO:MeCN	Мутный, опалесцирует	568,245
3	MeCN	Прозрачный	504,128
4	MeOH	Прозрачный	364,120
5	MeCN:MeOH	Прозрачный	401,237

Мутные и опалесцирующие образцы 1 и 2, несмотря на высокие значения площади пика, исключили, так как их использование предполагало в дальнейшем сложные варианты кондиционирования колонки и ее скорый выход строя. Варианты 4 и 5 не могли быть использованы ввиду низкой площади пика ЛХС-1208. В итоге был выбран третий вариант.

В результате была разработана следующая методика выделения ЛХС-1208 из биологических образцов.

Методика для образцов плазмы крови

К 200 мкл плазмы крови прибавляли 600 мкл охлажденного ацетонитрила, перемешивали 30 секунд на вортексе и центрифугировали со скоростью 4000 об/мин при 4°C в течении 10 мин. Супернатант отделяли и анализировали методом ВЭЖХ.

Методика для образцов мочи

К 100 мкл мочи прибавляли 1 мл охлажденного ацетонитрила и центрифугировали в указанных выше условиях. Супернатант отделяли и анализировали методом ВЭЖХ.

На хроматограммах наблюдали пики, времена удерживания которых соответствовали ЛХС-1208.

Дополнительным подтверждением соответствия данных пиков ЛХС-1208 был УФ-спектр, также соответствующий спектру ЛХС-1208.

Для оценки линейности и количественного определения ЛХС-1208 в плазме крови мышей построен калибровочный график в диапазоне от 1 до 100 мкг/мл

ЛХС-1208 в 1мл плазмы при детектировании при длине волны 315нм. Отклик ЛХС-1208 в указанном диапазоне был линеен (Рисунок 34).

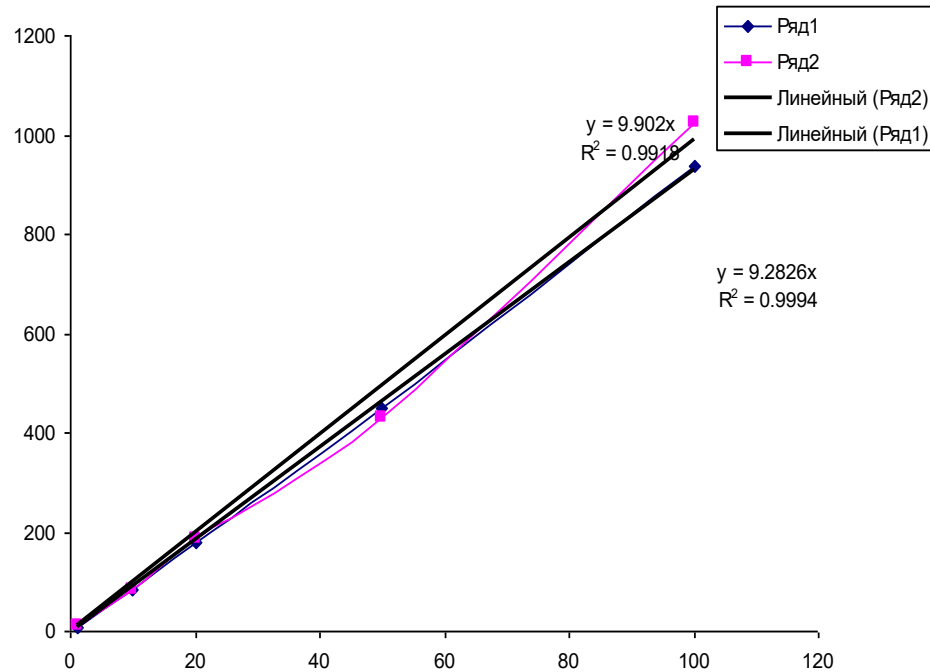
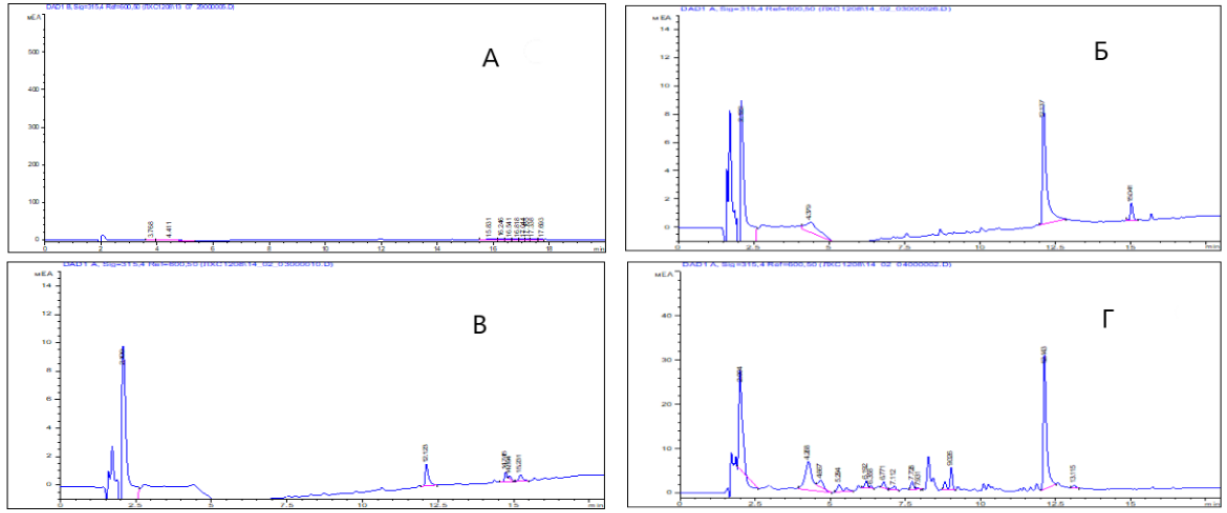


Рисунок 34 – Калибровочный график зависимости площади пика ЛХС 1208 от концентрации в плазме крови мышей в диапазоне от 1 до 100 мкг/мл

Для подтверждения возможности использования разработанной методики для определения ЛХС-1208 в биологических жидкостях *in vivo* проведено пилотное фармакокинетическое исследование. ЛХС-1208 вводили мышам внутривенно в дозе 25 мг/кг. Кровь на анализ отбирали через 0,083, 15, 30, 60, 120, 180 и 300 мин после введения. Дополнительно брали кровь у мышей контрольной группы (без введения ЛХС-1208). На каждый анализ объединяли образцы плазмы 2 мышей. Мочу для определения ЛХС-1208 собирали от 3 мышей одновременно.

На хроматограммах образцов, полученных из плазмы мышей контрольной группы, пик, соответствующий ЛХС-1208, не наблюдали (Рисунок 35 А). На хроматограммах образцов плазмы мышей, получивших ЛХС-1208 (Рисунки 35 Б, В), присутствовали пики с временем удерживания около 12 мин, соответствующие ЛХС-1208. Площадь данных пиков уменьшалась в зависимости

от времени, прошедшего с момента введения ЛХС-1208. УФ-спектры данных пиков также подтверждали их соответствие ЛХС-1208 (Рисунок 35).



А - хроматограмма образцов плазмы мышей без введения ЛХС-1208;
 Б - хроматограмма образцов плазмы мышей через 15 минут после введения ЛХС-1208;
 В - хроматограмма образцов плазмы мышей через 5 часов после введения ЛХС-1208
 Г - хроматограмма суммарных образцов мочи мышей, взятой в период от 8 до 24 часов после введения ЛХС-1208

Рисунок 35 – Хроматограммы образцов плазмы и мочи мышей

В растворах, полученных из суммарных образцов мочи, взятой в период от 8 до 24 часов после введения, также наблюдали пики, соответствующие ЛХС-1208 по времени удерживания (Рисунок 35 Г) и УФ-спектры (Рисунок 36).

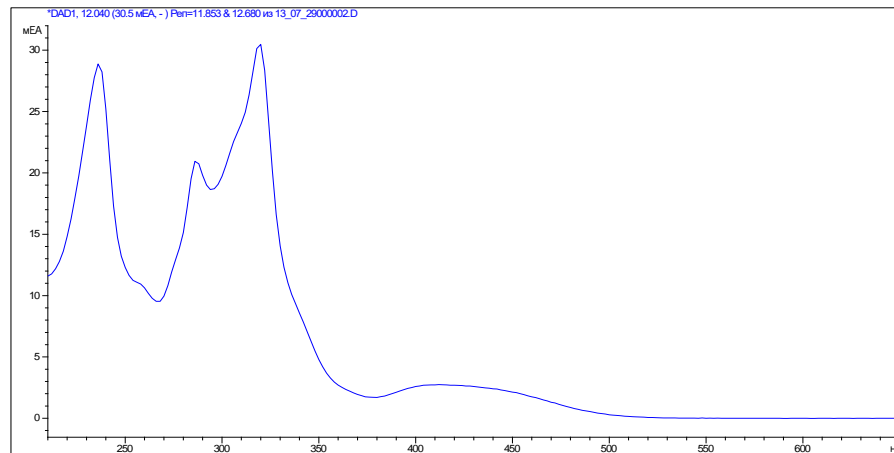


Рисунок 36 –УФ-спектр пиков со временем удерживания 11,987-12,146 минуты хроматограмм Б-Г

На основе полученных данных построен график полулогарифмической зависимости концентрации ЛХС-1208 в плазме крови мышей от времени, прошедшего с момента введения ЛС (Рисунок 37) [21].

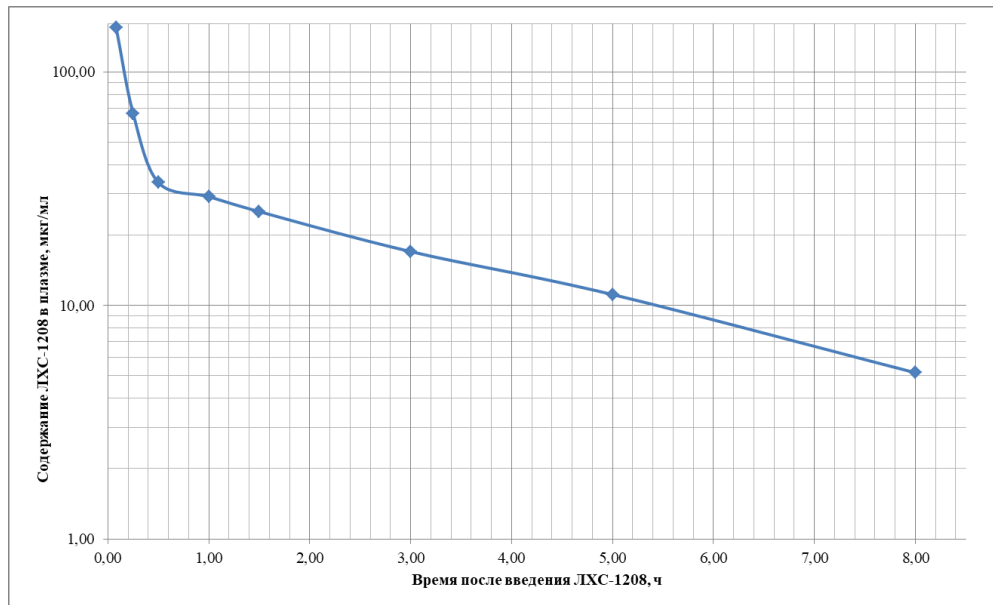


Рисунок 37 – Зависимость содержания ЛХС-1208 в плазме крови мышей от времени после его внутривенного введения

В дальнейшем разработанная методика может применяться при фармакокинетических исследованиях других производных индолокарбазола.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. Исследованы спектральные характеристики ЛХС-1208 в ^1H -ЯМР, ИК, УФ и МСМС-спектрах высокого разрешения, позволившие доказать структуру ЛХС-1208. Установлена возможность использования спектральных методов для подтверждения подлинности субстанции ЛХС-1208.

2. Исследованы физико-химические свойства субстанции ЛХС-1208: внешний вид, растворимость, удельный угол вращения, отсутствие органически связанного хлора, сульфатной золы и тяжелых металлов; определена потеря в массе при высушивании и содержание воды.

3. Разработана методика количественного определения действующего вещества и родственных примесей в субстанции ЛХС-1208 методом ВЭЖХ.

4. На основе полученных данных выбраны показатели качества для фармацевтической субстанции ЛХС-1208. Установлены нормы качества для субстанции ЛХС-1208 для разработки проекта НД по качеству.

5. Проведено исследование стабильности и установлен срок годности для субстанции ЛХС-1208, который составил 2 года при хранении фармацевтической субстанции в сухом защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°C (в холодильной камере).

6. Доказана возможность применения метода ВЭЖХ для количественного определения ЛХС-1208 в биологических жидкостях при фармакокинетических исследованиях – показано, что ЛХС-1208 в неизменном виде определяется в плазме крови и моче мышей. Разработана оптимальная методика подготовки проб биологических жидкостей для фармакокинетических исследований ЛХС-1208.

ГЛАВА 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА И РАЗРАБОТКА МЕТОДИК АНАЛИЗА СУБСТАНЦИИ ЛХС-1269

4.1 Подтверждение структуры ЛХС-1269 спектральными методами

Также как и для ЛХС-1208, для определения и подтверждения структуры ЛХС-1269 были применены ^1H -ЯМР спектроскопия высокого разрешения, ИК-Фурье спектроскопия, УФ-спектрофотометрия и тандемная масс-спектрометрия высокого разрешения.

4.1.1 Применение метода ^1H -ЯМР спектроскопии

^1H -ЯМР спектры ЛХС-1269 записывали с применением DMSO-d_6 в качестве растворителя и тетраметилсилана в качестве внутреннего стандарта.

^1H -ЯМР спектры лабораторных образцов субстанции ЛХС-1269 имели следующие сигналы (Рисунок 38): (δ м.д., J Hz): 11,44 (с, 1H, NH-индол), 9,18 (д 1H, Ar), 9,16 (д, 1H, Ar), 8,84 (с, 1H, NH), 8,15-7,39 (м, 10H, Ar), 6,24 (ушир. д. 1H, H1'), 4,70-3,75 (м, 5-H, H2', H3', H4', H5', H5'').

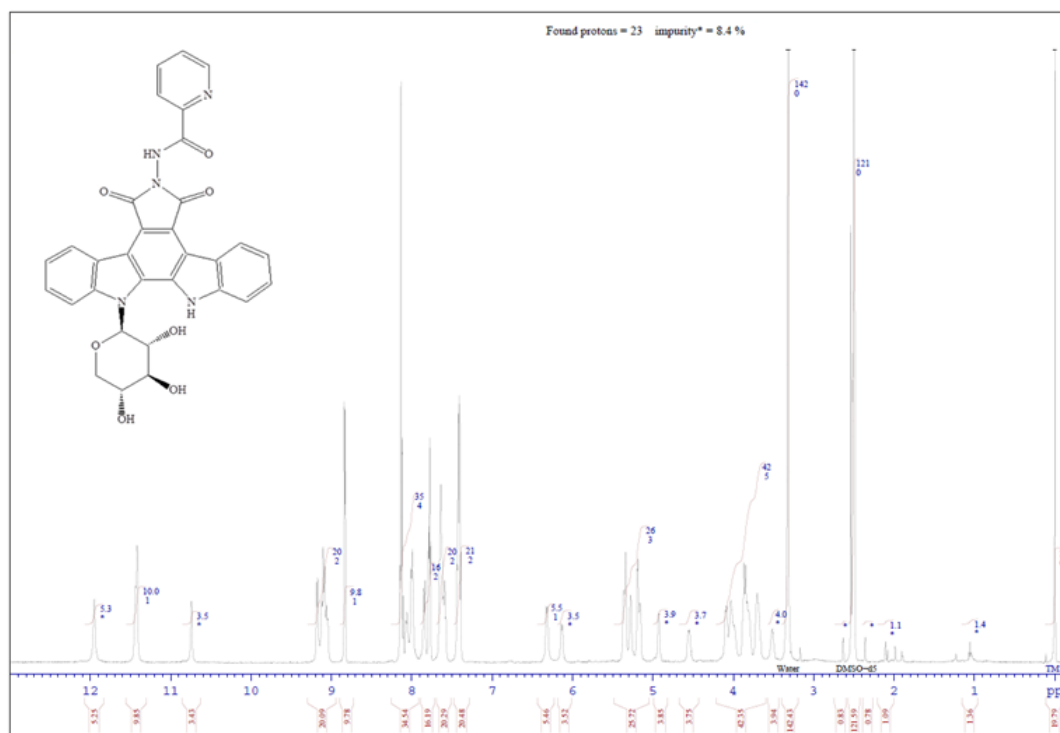


Рисунок 38 – $^1\text{H-NMR}$ спектр ЛХС-1269 в DMSO-d_6

4.1.2 Применение метода ИК-спектроскопии

Методика

Около 2 мг ЛХС-1269 растирали в агатовой ступке с 200 мг прокаленного калия бромида и запрессовывали в диски. ИК-спектры записывали в диапазоне от 4000 до 400 см^{-1} при 32 сканированиях в минуту.

Спектры изученных лабораторных образцов ЛХС-1269 (Рисунок 39) содержали следующий набор характеристических полос пропускания [1;40]: 3371 см^{-1} (ν ОН, NH as и s), 1769 ; 1712 см^{-1} (ν C=O as и s), 1573 см^{-1} (ν C_{ar}-C_{ar}), 1497 ; 1459 см^{-1} (δ N-H имидн.), 1238 см^{-1} (δ O-H, ν C-N имидн.), 1120 ; 1045 см^{-1} (ν C-ОН, ν C-N амин), 748 ; 615 см^{-1} (δ C-H ароматич.) [43].

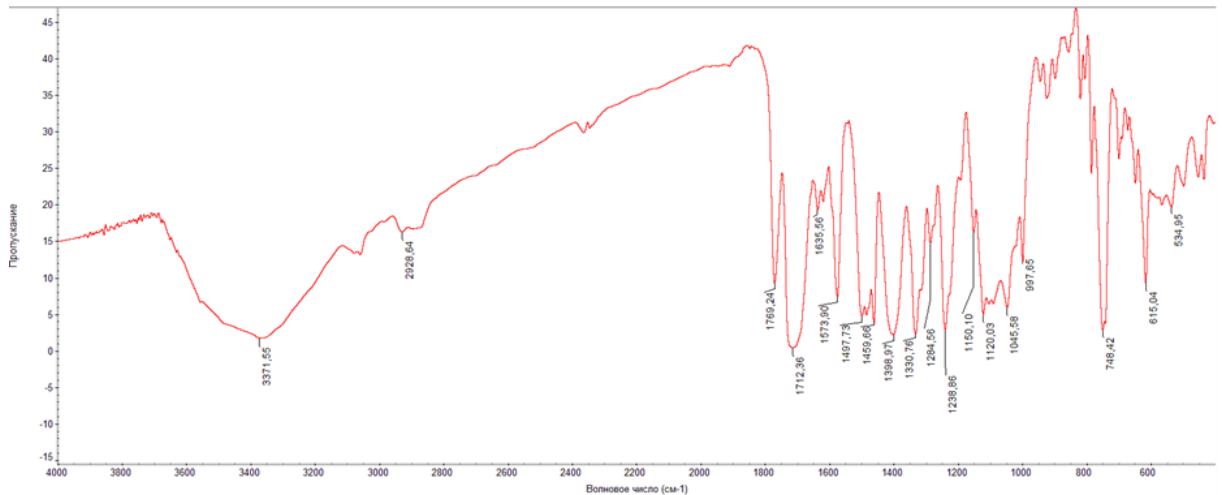


Рисунок 39 – ИК-спектр ЛХС-1269 (2мг в 200 мг KBr)

4.1.3 Применение метода УФ-спектрофотометрии

Методика

Около 0,005 г (точная навеска) ЛХС-1269 растворяли в ДМФА в мерной колбе вместимостью 25 мл, доводили объём раствора до метки тем же растворителем и перемешивали. 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили до метки ДМФА и перемешивали.

УФ-спектры записывали в диапазоне от 200 до 600 нм в кювете из кварцевого стекла толщиной поглощающего слоя 10 мм, используя ДМФА в качестве раствора сравнения.

Удельный показатель поглощения рассчитывали по формуле (1).

Спектры ЛХС-1269 демонстрировали максимумы поглощения при λ 286±2 нм и 319±2 нм, слабоинтенсивный максимум при 413±2 нм; плечо при 308±2 нм; плечо при 337±2 нм и минимумы при 278±2 нм, 295±2 нм и 375±2 нм (Рисунок 40). Отношение значений оптической плотности в максимумах D319/D286 для изученных образцов, в отличие от УФ-спектра ЛХС-1208 составляло 2,02±0,05, что объясняется наличием в его структуре дополнительного ароматического гетероцикла [40]. Рассчитанное значение удельного показателя поглощения в наиболее интенсивном максимуме поглощения при λ 319±2 нм укладывалось в

пределы 1070 ± 30 (Таблица 13). За счет своей интенсивности аналитический сигнал при 319 нм является наиболее пригодным для количественных определений.

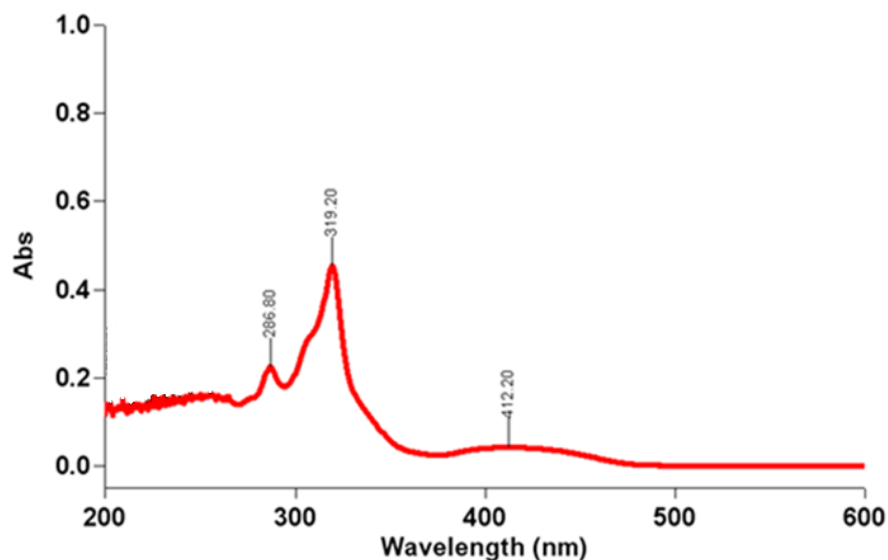


Рисунок 40 – УФ-спектр ЛХС-1269 (0,0004% раствор в ДМФА)

Таблица 13 – Удельный показатель поглощения для различных серий ЛХС-1269 (0,0004% раствор в ДМФА)

Образец №	Удельный показатель поглощения $\lambda_{\max} 319 \pm 2$ нм*	Оптическая плотность при 319 ± 2 нм*	Оптическая плотность при 286 ± 2 нм*	Соотношение A319/D286*
1	1079	0,391	0,197	1,98
2	1069	0,424	0,213	1,99
3	1073	0,482	0,238	2,02
4	1100	0,602	0,296	2,03
5	1082	0,562	0,281	2,00

*Примечание – среднее значение из шести определений

Проведенные исследования показали, что УФ-спектр ЛХС-1269 имеет специфичный профиль и спектральное отношение и может быть использован для подтверждения подлинности фармацевтической субстанции.

4.1.4 Применение метода тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения

Методика

Смесь растворителей ДМСО-ацетонитрил (1:9)

К 90 мл ацетонитрила прибавляли 10 мл ДМСО и перемешивали.

Смесь растворителей вода-ацетонитрил-муравьиная кислота (1:9:0,1)

К 90 мл ацетонитрила прибавляли 10 мл деионизованной воды и 0,1 муравьиной кислоты, перемешивали.

Испытуемый раствор

Около 10 мг ЛХС-1269 (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл и растворяли в смеси ДМСО-ацетонитрил (1:9), доводили тем же растворителем до метки и перемешивали. 10 мкл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводили объем до метки смесью деионизованной воды, ацетонитрила и муравьиной кислоты (1:9:0,1).

1 мл полученного раствора вводили в источник ионов со скоростью подачи 0,6 мл/ч.

Общее время сканирования составляло 23 мин, время одного сканирования – 0,346 с, при общем числе сканирований 3993. Ионизацию производили методом “электроспрей” под напряжением ионизации +5500 V при давлении азота на распылителе и газа для десольватации в 55 psi. Температура в камере ионизации 450°C. Давление газовой завесы входной ионной оптики составляло 25 psi.

Регистрацию ионов проводили в диапазоне от 50 до 800 Да. Порог выбора ионов-прекурсоров по интенсивности составлял более 2500 ионов в секунду при потенциале диссоциации ионов-прекурсоров 80 V и энергии соударения от 30 до 15 V. Давление азота в ячейке соударительной диссоциации составляло 7psi.

На ИДА графиках полного ионного потока обнаруживали МСМС-спектры ионов-прекурсоров, соответствующих массе молекулы ЛХС-1269 с дополнительным присоединенным протоном.

Масса протонированного иона-прекурсора со значением m/z $[M+H^+]$ – 578,1672 Да при вычитании массы одного протона полностью соответствует молекулярной массе ЛХС-1269, рассчитанной на основе брутто-формулы $C_{31}H_{23}N_5O_7$, равной 577,1597 Да. Полученные МСМС-спектры ионов-прекурсоров всех лабораторных образцов субстанции ЛХС-1269 не отличались друг от друга (Рисунок 41).

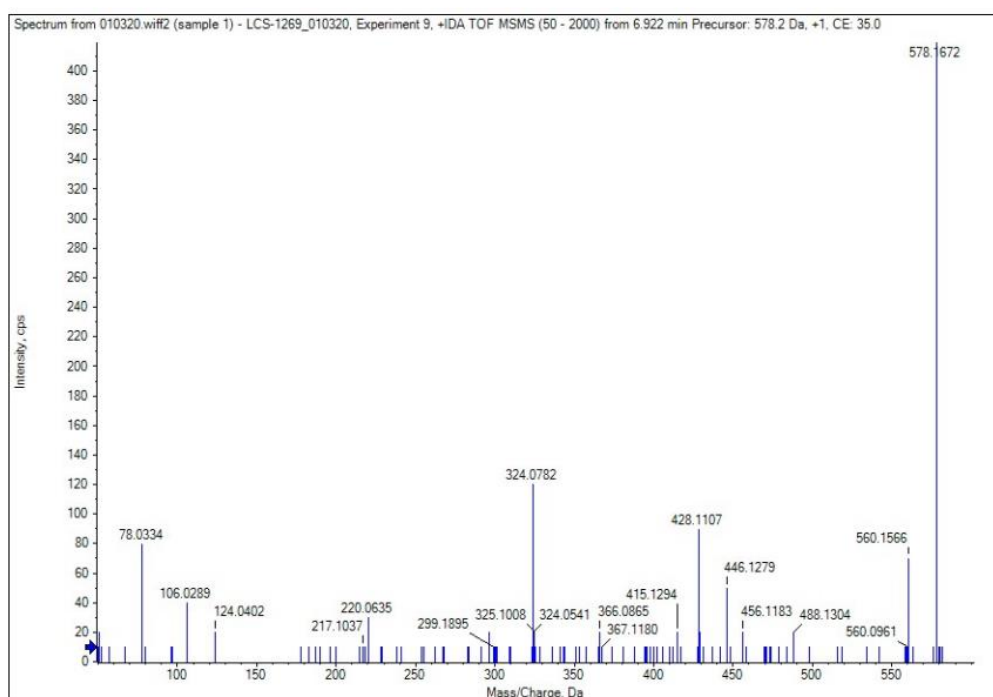


Рисунок 41 – МСМС-спектр $[M+H^+]$ ЛХС-1269

Как видно на рисунках 33 и 41, МСМС-спектр ЛХС-1269 имеет ряд дочерних ионов с МСМС-спектром ЛХС-1208 значениями m/z . Близкие значения m/z имеют следующие дочерние ионы: 456,1207 и 456,1183 Да; 415,1306 и 415,1294 Да; 366,0908 Да и 366,0865 Да. Также обнаружен один дочерний ион с одинаковым значением m/z для обоих спектров 324,0782 Да. Столь большое число общих дочерних ионов объясняется схожестью молекул ЛХС-1208 и ЛХС-1269.

4.2 Определение физико-химических свойств фармацевтической субстанции ЛХС-1269

4.2.1 Характеристика внешнего вида

При рассмотрении невооруженным глазом все исследуемые лабораторные образцы субстанции ЛХС-1269 представляли собой аморфный порошок желтого цвета [40].

При десятикратном увеличении в УФ-свете образцы субстанции ЛХС-1269 также представляли собой аморфный порошок желтого цвета (Рисунок 42).

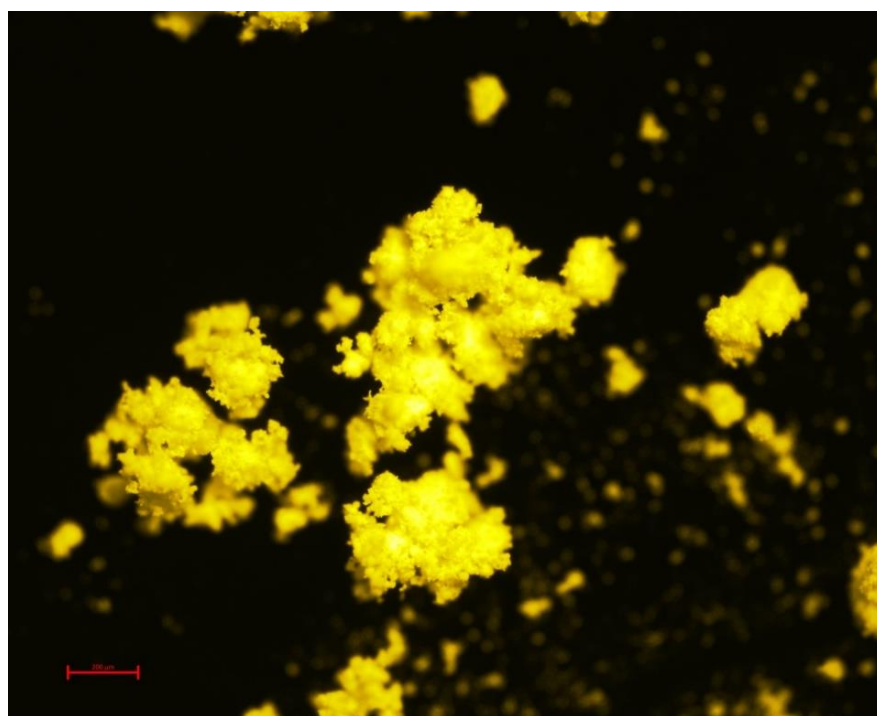


Рисунок 42 – Микрофотография образца фармацевтической субстанции ЛХС-1269 (X10)

4.2.2 Определение растворимости

Все образцы фармацевтической субстанции ЛХС-1269 растворимы в ДМСО (1: 15), умеренно растворимы в ДМФА (1:40), очень мало растворимы в 95 % этаноле (1:9000) и практически нерастворимы в воде (более 1:10000). Растворы ЛХС-1269, концентрацией 0,4-0,004% в ДМСО и ДМФА были прозрачны и имели желтый цвет с зеленой флуоресценцией [40].

4.2.3 Определение удельного вращения

Методика

Около 0,25 г субстанции (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 10 мл ДМФА и перемешивали до полного растворения. Полученный раствор доводили ДМФА до метки.

Показатель удельного вращения определяли на поляриметре Unipol L в кювете длиной 10 см с использованием ДМФА в качестве образца сравнения.

В Таблице 14 приведены значения удельного вращения для изучаемых лабораторных образцов субстанции ЛХС-1269.

Таблица 14 – Значение удельного вращения для образцов субстанции ЛХС-1269 (1% раствор в ДМФА)

Образец №	Удельное вращение*
1	+ 59°
2	+ 60°
3	+ 59°
4	+ 60°
5	+ 59°

*Примечание – среднее значение из шести определений

Проведенные исследования показали, что значение удельного угла вращения, для субстанции ЛХС-1269, находится в диапазоне от +59° до +60°.

4.2.4 Определение органически связанного хлора

Так как для синтеза ЛХС-1269 применяли ряд хлорорганических реагентов [116;63], для образцов фармацевтической субстанции проведено определение содержания органически связанного хлора методом сжигания в колбе с кислородом (по Шёнигеру) в соответствии с ОФС.1.2.3.0010.15.

Во всех исследуемых образцах субстанций органически связанного хлора не обнаружено [40].

4.2.5 Определение сульфатной золы и тяжелых металлов

В исследуемых образцах фармацевтической субстанции ЛХС-1269 проведены исследования на допустимое содержание сульфатной золы и тяжелых металлов согласно ОФС.1.2.2.2.0014.15 и ОФС.1.2.2.2.0012.15, соответственно.

Полученные в ходе исследования данные полностью соответствовали требованиям ГФ РФ, так как в образцах ЛХС-1269 содержание сульфатной золы не превысило 0,05%. Также, все образцы выдерживали испытания на тяжелые металлы, так как их содержание не превышало 0,001% [40].

4.2.6 Определение содержания воды

Определение содержания воды для ЛХС-1269 проводили методом титрования по К. Фишеру, в соответствии с требованиями ОФС.1.2.3.0002.15. Результаты исследования приведены в Таблице 15.

Таблица 15 – Содержание воды в образцах субстанции ЛХС-1269

Образец №	Содержание воды %*
1	2,45
2	2,26
3	2,01
4	2,08
5	0,92

*Примечание – среднее значение из шести определений

Полученные результаты свидетельствуют, что содержание воды не превышает 2,5 % [40].

4.3 Определение примесей и количественного содержания действующего вещества в фармацевтической субстанции ЛХС-1269

4.3.1 Определение примесей и количественного содержания методом ВЭЖХ

Количественный анализ субстанции ЛХС-1269 проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1200 с диодно-матричным детектором при градиентном режиме элюирования.

Методика

Смесь растворителей ДМСО-ацетонитрил (1:9)

К 90 мл ацетонитрила прибавляли 10 мл ДМСО и перемешивали.

Смесь растворителей вода-ацетонитрил (1:1)

К 500 мл деионизованной воды прибавляли 500 мл ацетонитрила и перемешивали.

Подвижная фаза А

К 900 мл деионизованной воды прибавляли 100 мл ацетонитрила и 1 мл трифторуксусной кислоты, перемешивали.

Подвижная фаза В

К 950 мл ацетонитрила прибавляли 50 мл деионизованной воды и 1 мл трифторуксусной кислоты, перемешивали.

Анализируемый раствор

Около 0,010 г ЛХС-1269 (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяли в 5 мл смеси ДМСО-ацетонитрил (1:9), доводили объем до метки тем же растворителем и перемешивали. 5 мл полученного раствора переносили в колбу вместимостью 50 мл, доводили до метки смесью вода-ацетонитрил (1:1 по объему) и перемешивали.

Элюирование проводили в градиентном режиме. Хроматографические условия указаны в Таблице 16.

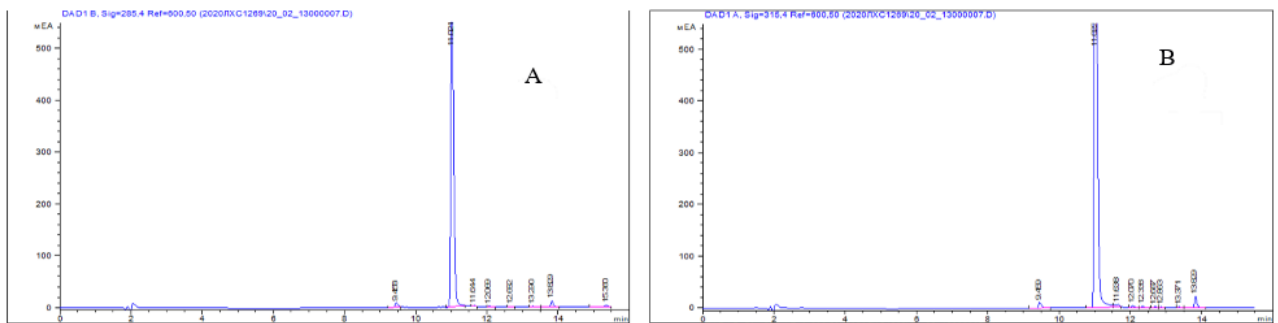
Таблица 16 – Хроматографические условия для количественного анализа субстанции ЛХС-1269

ПФ А	Вода - ацетонитрил - трифторуксусная кислота 900:100:1	
ПФ Б	Ацетонитрил - вода - трифторуксусная кислота 950:50:1	
Колонка	Zorbax SB-C18 длиной 150 мм, диаметром 3 мм, диаметр зерна сорбента – 5 мкм	
Градиент		
Время (мин)	ПФ А (%)	ПФ Б (%)
0,0	100	0
12,5-15,0	0	100
15,0	Остановка метода	
Объем вводимой пробы (мкл)	5	
Скорость потока (мл/мин)	0,4	
Температура колонки °С	40	
Длина волны детектора (нм)	285±5 и 315±5	

Определение содержания действующего вещества или любой примеси, производили методом внутренней нормализации по формуле (2).

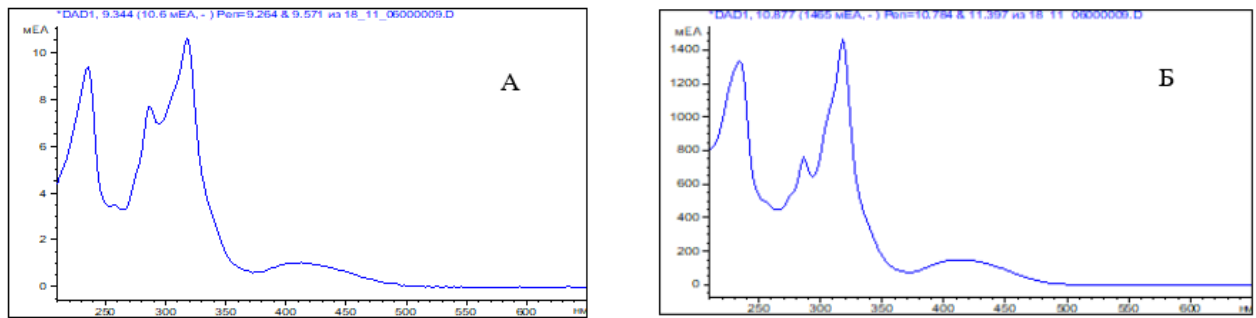
В предложенных условиях время удерживания (RT) основного пика в образцах ЛХС-1269 составило 10,88 мин (Рисунок 43, А; Б). УФ спектр данного пика совпадал со спектром субстанции ЛХС-1269 (рисунок 44 Б). На хроматограммах присутствовали также два пика с RT 9,34 мин и 13,69 мин. И ряд пиков микропримесей с RT около 11,53 мин, 11,92 мин и 12,20 мин (Рисунок 43, А; Б). Спектры всех примесей, полученные в ходе исследования, показывают, что примеси с временами удерживания большими, чем у ЛХС-1269, имеют спектры идентичные спектру действующего вещества (Рисунок 44, Б), в то время как примесь со временем удерживания 9,34 мин имеет УФ-спектр (Рисунок 44, А)

близкий к спектру ЛХС-1208. Таким образом, можно заключить, что все примеси, обнаруженные в субстанции ЛХС-1269, являются родственными и содержат индолокарбазольное ядро. Пригодность хроматографической системы для анализа субстанции ЛХС-1269 подтверждается в разделе 4.5.1.



А – аналитическая длина волны 285 нм
В – аналитическая длина волны 315 нм

Рисунок 43 – Хроматограмма субстанции ЛХС-1269 при 285 нм и 315 нм



А – ЭСП примеси со временем удерживания 9.344 мин.
Б – ЭСП действующего вещества со временем удерживания 10.877 мин.

Рисунок 44 – УФ пиков действующего вещества и примеси субстанции ЛХС-1269

Проведенные исследования показали, что содержание действующего вещества в образцах субстанции ЛХС-1269 составляло не менее 97,00 % (таблица 17), Содержание примеси с RT 9,34 мин не превышало 0,90 %, а примеси с RT 13,69 мин не превышало 1,40 %. Сумма пиков микропримесей не превышала 1%. Все обнаруженные примеси являются родственными ЛХС-1269 [17; 40; 30].

Таблица 17 – Содержание действующего вещества в образцах субстанции ЛХС- 1269

Образец №	Содержание действующего вещества, % *	Содержание примеси с RT 9,34 мин, % *	Содержание примеси с RT 13,69 мин, % *
1	97,8	0,80	1,39
2	98,1	0,85	1,43
3	97,6	0,29	1,16
4	98,5	0,45	0,33
5	98,4	0,36	0,35

*Примечание – среднее значение из шести определений

В дальнейшем, увеличив скорость потока и уменьшив концентрацию ЛХС-1269 в анализируемом растворе со 100 мкг/мл до 50 мкг/мл, была проведена оптимизация методики. Время, затрачиваемое на один анализ, сократилось с 15 до 7 минут. Регистрация пиков в оптимизированной методике велась при наиболее оптимальной для действующего вещества и примесей длине волны в 315 нм.

Оптимизированная методика

Испытуемый раствор

Около 0,010 г (точная навеска) ЛХС-1269 помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяли в 10 мл смеси ДМСО-ацетонитрил (1:9) и перемешивали. 2,5 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили до метки смесью вода-ацетонитрил (1:1) и перемешивали.

Элюирование вели в градиентном режиме. Хроматографические условия приведены в Таблице 18.

Таблица 18 – Хроматографические условия для количественного анализа субстанции ЛХС-1269 после оптимизации

ПФ А	Вода - ацетонитрил - трифторуксусная кислота 900:100:1	
ПФ Б	Ацетонитрил - вода - трифторуксусная кислота 950:50:1	
Колонка	Zorbax SB-C18 длиной 150 мм диаметром 3 мм, диаметр зерна сорбента 5 мкм	
Градиент		
Время (мин)	ПФ А (%)	ПФ Б (%)
0,0	100	0
6,4-7,0	0	100
7,0	Остановка метода	
Объем вводимой пробы (мкл)	5	
Скорость потока (мл/мин)	0,5	
Температура колонки °С	40	
Длина волны детектора (нм)	315±5	

В условиях оптимизированной методики РТ основного действующего вещества ЛХС-1269 составило 3,9-4,0 мин (Рисунок 45). На хроматограммах присутствовали также два пика с РТ 2,11 мин и 6,56 мин. И ряд пиков микропримесей с РТ около 4,66 мин, 5,05 мин и 5,29 мин [110]. Содержание основного вещества и примесей осталось неизменным.

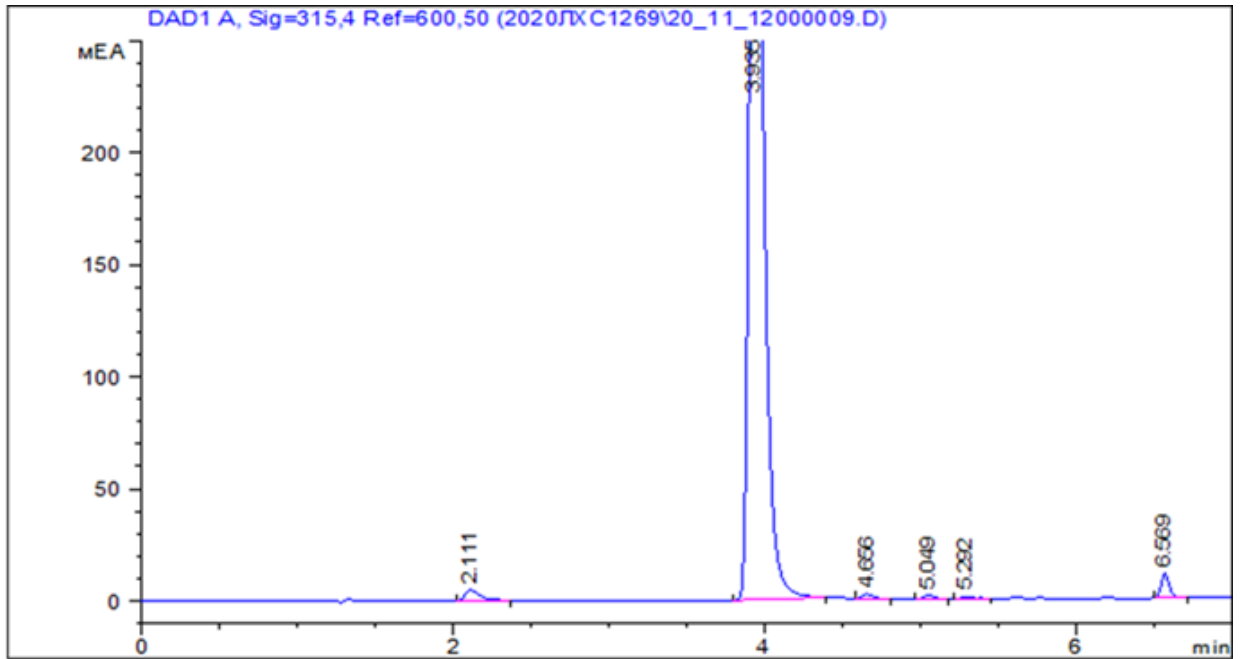


Рисунок 45 – Хроматограмма субстанции ЛХС-1269 по оптимизированной методике

4.3.2 Идентификация примесей в субстанции ЛХС-1269 методом ВЭЖХ-МСМС

Как было написано в разделе 4.3.1, в субстанции ЛХС-1269 присутствовала примесь со значением RT около 9,34 мин или 2,11 мин в оптимизированной методике, с содержанием в субстанции около 0,9% и получившая шифр ЛХС-1269-Х. УФ-спектр данной примеси совпадал со спектром ЛХС-1208. Однако ЛХС-1269 и ЛХС-1208 содержат разные углеводные остатки: ЛХС-1208 является арабинозидом, а ЛХС-1269, – ксилозидом. Для синтеза этих двух субстанций используют разные исходные соединения на первой стадии синтеза [24; 63] (рисунок 7), что делает невозможным присутствие ЛХС-1208 в ЛХС-1269.

Предположено, что ЛХС-1269-Х является по своей структуре 6-амино-12-(β-D-ксилопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дионом, имеющий брутто-формулу $C_{26}H_{15}N_5O_3$ (Рисунок 46). Для подтверждения данного

предположения была проведена идентификация структуры примеси ЛХС-1269-Х с применением метода ВЭЖХ-МСМС.

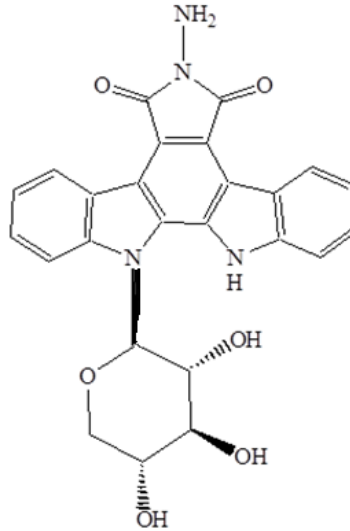


Рисунок 46 – Предполагаемая структура примеси ЛХС-1269-Х

Указанное соединение может образоваться в качестве побочного продукта на одной из последних стадий синтеза ЛХС-1269 за счет наличия остатков гидразина в гидразиде пиколиновой кислоты. Для подтверждения этого предположения 6-амино-12-(β-D-ксилопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион, был получен направленным встречным синтезом и после подтверждения структуры применен в качестве образца сравнения.

Идентификацию проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1260 Infinity II. Первичное детектирование осуществляли на диодно-матричном детекторе, а вторичное на тандемном масс-спектрометре SCIEX X500R QTOF в IDA-режиме.

Методика

Смесь растворителей ДМСО-ацетонитрил (1:9)

К 90 мл ацетонитрила прибавляли 10 мл ДМСО и перемешивали.

Смесь растворителей вода-ацетонитрил (1:1)

500 мл деионизованной воды смешивали с 500 мл ацетонитрила и перемешивали.

Подвижная фаза А

К 900 мл деионизованной воды прибавляли 100 мл ацетонитрила и 1мл муравьиной кислоты, перемешивали.

Подвижная фаза В

К 950 мл ацетонитрила прибавляли 50 мл деионизованной воды и 1мл муравьиной кислоты, перемешивали.

Испытуемый раствор для ВЭЖХ

Около 0,010 г ЛХС-1269 (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяли в 10 мл смеси ДМСО-ацетонитрил (1:9 по объёму) и перемешивали. 2,5 мл полученного раствора переносили во вторую мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили до метки смесью вода-ацетонитрил (1:1 по объёму) и перемешивали.

Испытуемый раствор для ВЭЖХ-МСМС

Около 0,010 г ЛХС-1269 (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяли в 10 мл смеси ДМСО-ацетонитрил (1:9) и перемешивали. 0,5 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили до метки смесью вода-ацетонитрил (1:1) и перемешивали.

Раствор образца сравнения

Около 0,001 г (точная навеска) 6-амино-12-(β-D-ксилопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-диона помещали в мерную колбу объемом 10 мл, растворяли в смеси ДМСО-ацетонитрил (1:9), доводили объем до метки тем же растворителем и перемешивали. 0,5 мл полученного раствора, переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили до метки смесью ацетонитрила и деионизованной воды в соотношении 1:1 и перемешивали.

Хроматографические условия приведены в Таблице 19.

Таблица 19 – Хроматографические условия и условия работы масс-спектрометра при идентификации примесей в субстанции ЛХС-1269

ПФ А	Вода - ацетонитрил - муравьиная кислота 900:100:1	
ПФ Б	Ацетонитрил - вода - муравьиная кислота 950:50:1	
Предколонка	Zorbax длиной 4,6 мм, диаметром 12,5 mm сорбент: СВ-С18 5-Micron	
Колонка	Poroshell 120 длиной 150 мм диаметром 3 mm, сорбент ЕС-С18 2,7 μm	
Градиент		
Время (мин)	ПФ А (%)	ПФ Б (%)
0,0	100	0
6,4-7,0	0	100
7,5-15,0	100	0
15,0	Остановка метода	
Объем вводимой пробы мкл	5	
Скорость потока мл/мин	0,5	
Температура колонки °С	40	
Длина волны детектора диодно-матричного детектора нм	315 \pm 5	
Режим работы масс-спектрометра		
Общее время сканирования мин	15	
Время одного сканирования сек	0,646	
Источник ионов	Электроспрей	
Напряжение источника ионов V	+5500	
Давление газа завесы входной ионной оптики psi	25	
Давление азота на распылителе psi	55	
Давление газа для десольватации psi	55	
Температура в камере ионизации °С	450	
Диапазон регистрации ионов (Да)	50-2000	
Порог выбора ионов-прекурсоров по интенсивности ион/с	10	
Потенциал диссоциации ионов-прекурсоров V	100	
Энергия соударения V	30-15	
Давление азота в ячейке соударительной диссоциации psi	7	

В указанных выше хроматографических условиях время удерживания основного пика по диодно-матричному детектору (рисунок 47) составило около 6,61 мин, а для ЛХС-1269-Х около 5,67 мин. Время удерживания для второй примеси, получившей название ЛХС-1269-У, составило 8,12 минуты.

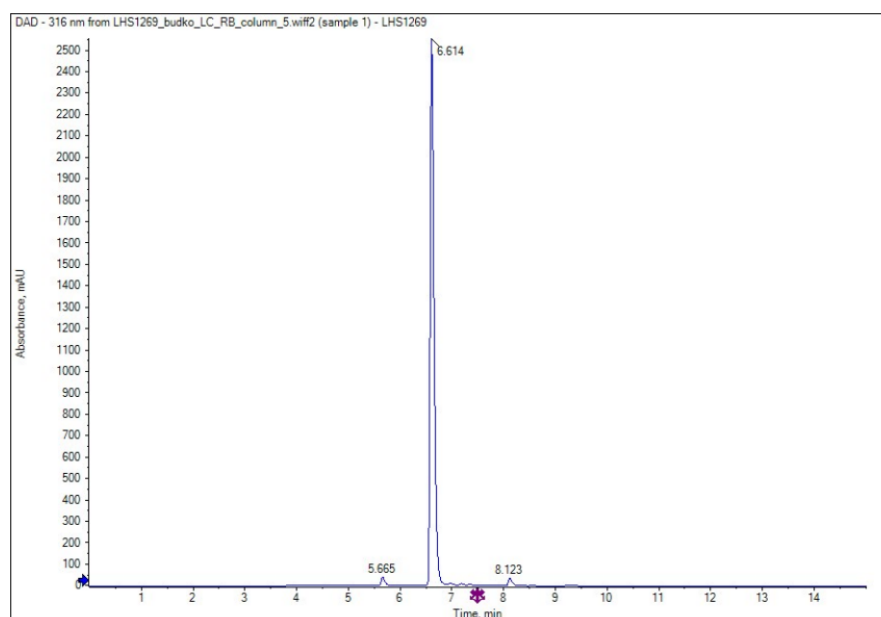


Рисунок 47 – Хроматограмма ЛХС-1269 (диодно-матричный детектор)

Времена удерживания пиков на экстрагированной ионной хроматограмме (Рисунок 48) с учетом дополнительного мертвого объема соответствовали временам удерживания ЛХС-1269-Х (около 5,7 мин) и ЛХС-1269 (около 6,7 мин). На ИДА графиках хроматограмм полного ионного потока на соответствующих временах удерживания обнаруживались МСМС-спектры ионов-прекурсоров со значением m/z 578,1672 Да и МСМС-спектром, соответствующим МСМС-спектру иона-прекурсора ЛХС-1269 (Рисунок 38). Данные графики на времени удерживания примеси ЛХС-1269-Х также показывали наличие ионов-прекурсоров со значением m/z 473,1462 Да, что соответствует времени удерживания примеси ЛХС-1269-Х. МСМС-спектры данного иона-прекурсора (Рисунок 49 Б) полностью соответствовали МСМС-спектру иона-прекурсора 6-амино-12-(β -D-ксилопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-диона. Время удерживания 6-амино-12-(β -D-ксилопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-

с]карбазол-5,7-диона на экстрагированной ионной хроматограмме (Рисунок 49 А) также соответствовало времени удерживания примеси ЛХС-1269-Х, что подтверждает предположение о ее строении и происхождении [12].

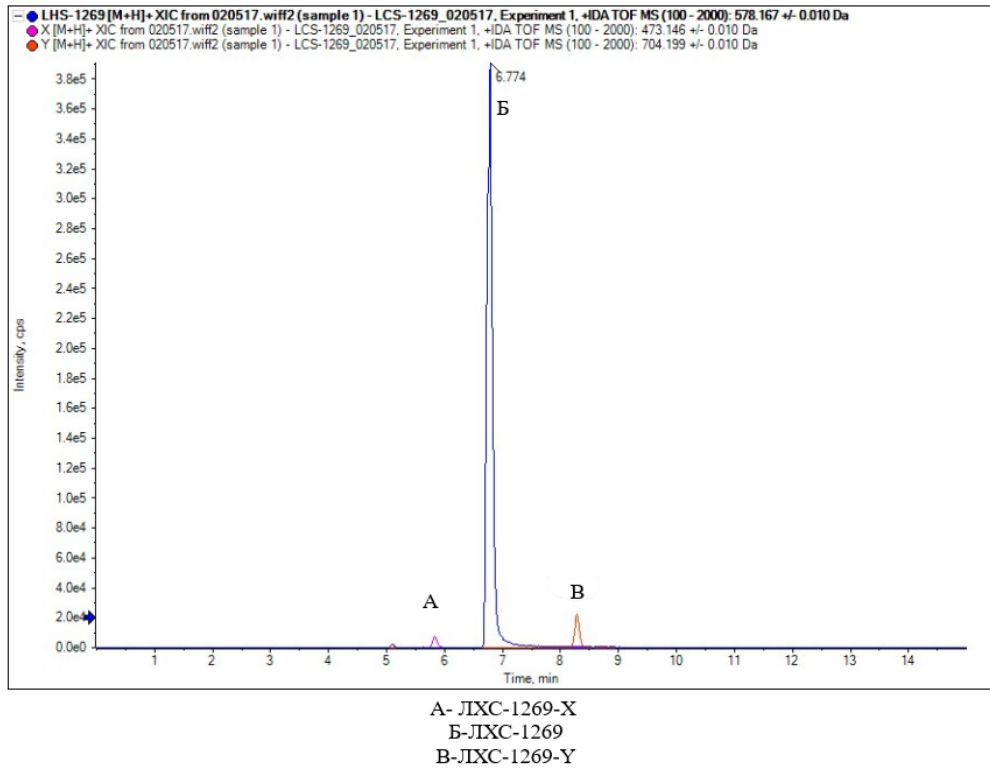


Рисунок 48 – Экстрагированная ионная хроматограмма субстанции ЛХС-1269 по ионам-прекурсорам ЛХС-1269, ЛХС-1269-Х и ЛХС-1269-У

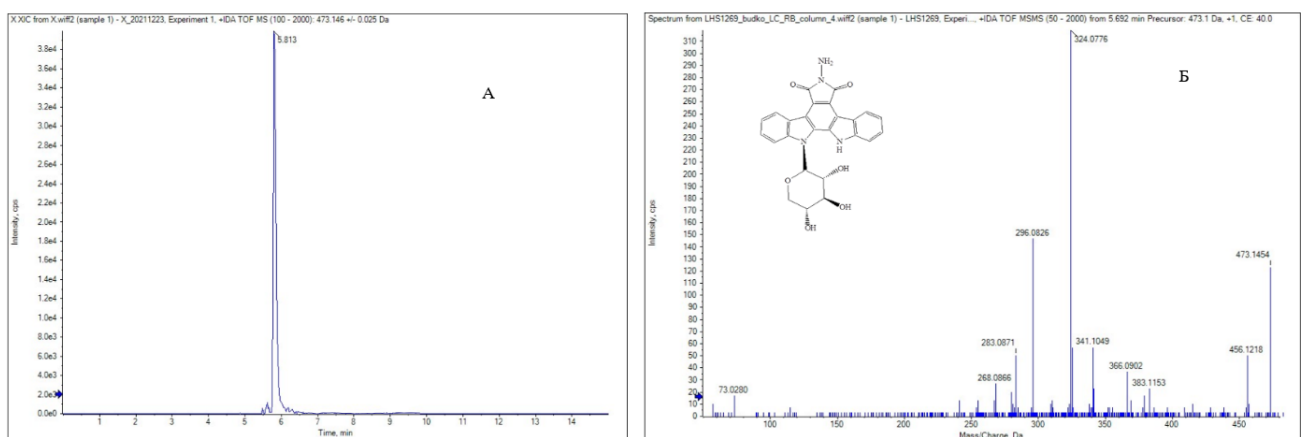


Рисунок 49 – Экстрагированная ионная хроматограмма и МСМС-спектр иона-прекурсора 6-амино-12-(β-D-ксилопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-диона

Также в IDA графиках на 8,28 мин был обнаружен ион-прекурсор со значением m/z 704,1992 Да, который имеет на экстрагированной ионной хроматограмме пик, соответствующий по времени удерживания пику примеси ЛХС-1269-У. Основываясь на данных МСМС-спектра (Рисунок 51 Б) было выявлено, что по строению данная примесь имеет общие дочерние ионы с ЛХС-1269, а на основании схемы синтеза ЛХС-1269 было высказано предположение, что данная примесь является *N*-[12-(2,3,4-три-*O*-ацетил- β -*D*-ксилопиранозил)индоло-[2,3-а]пирроло-[3,4-с]карбазол-5,7-дион-6-ил]пиридин-2-карбоксамидом (Рисунок 50) с брутто-формулой $C_{37}H_{29}N_5O_{10}$ и молекулярной массой 703,1914. Данное соединение является промежуточным продуктом химического синтеза субстанции ЛХС-1269 и может оставаться в ней по причине его неполного омыления на последней стадии синтеза (Рисунок 7).

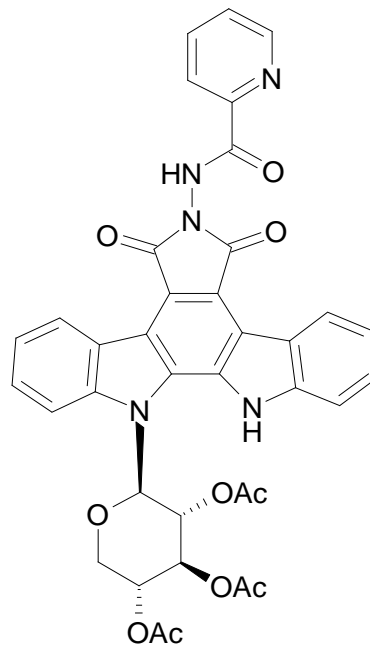


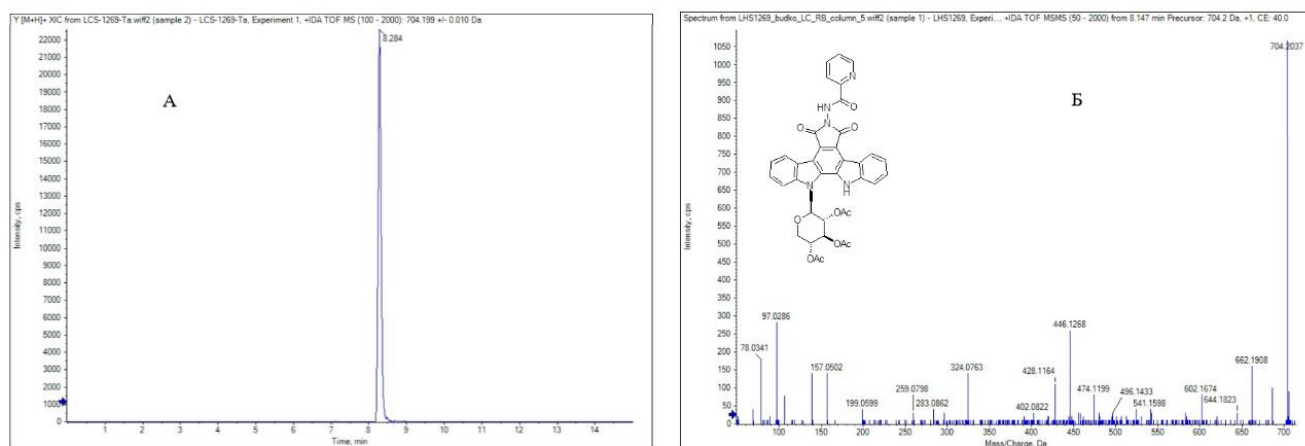
Рисунок 50 – Предполагаемая структура примеси ЛХС-1269-У

Для подтверждения этого предположения был проведен направленный встречный синтез *N*-[12-(2,3,4-три-*O*-ацетил- β -*D*-ксилопиранозил)индоло-[2,3-а]пирроло-[3,4-с]карбазол-5,7-дион-6-ил]пиридин-2-карбоксамиды, который был использован в качестве образца сравнения.

Раствор образца сравнения

Около 0,001 г (точная навеска) *N*-[12-(2,3,4-три-*O*-ацетил- β -*D*-ксилопиранозил)индоло-[2,3-а]пирроло-[3,4-с]карбазол-5,7-дион-6-ил]пиридин-2-карбоксамида помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяли в смеси ДМСО-ацетонитрил (1:9), доводили объем до метки тем же растворителем и перемешивали. 0,5 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили до метки смесью ацетонитрила и деионизованной воды (1:1).

На полученных в ходе эксперимента ИДА-графиках ВЭЖХ-МСМС анализа раствора *N*-[12-(2,3,4-три-*O*-ацетил- β -*D*-ксилопиранозил)индоло-[2,3-а]пирроло-[3,4-с]карбазол-5,7-дион-6-ил]пиридин-2-карбоксамида на времени удерживания, аналогичному времени удерживания для примеси ЛХС-1269-У наличествовали ионы-прекурсоры со значением m/z около 704,2037 Да. Полученные МСМС-спектры соответствовали примеси ЛХС-1269-У по дочерним ионам (Рисунок 51 Б), а время удерживания пика на экстрагированной ионной хроматограмме (Рисунок 51 А) также совпадало со временем удерживания примеси ЛХС-1269-У, что подтвердило предположение о строении и происхождении этой примеси [11].



А – Экстрагированная ионная хроматограмма *N*-[12-(2,3,4-три-*O*-ацетил- β -*D*-ксилопиранозил)индоло-[2,3-а]пирроло-[3,4-с]карбазол-5,7-дион-6-ил]пиридин-2-карбоксамида
 Б – МСМС-спектр иона-прекурсора *N*-[12-(2,3,4-три-*O*-ацетил- β -*D*-ксилопиранозил)индоло-[2,3-а]пирроло-[3,4-с]карбазол-5,7-дион-6-ил]пиридин-2-карбоксамида

Рисунок 51 – Экстрагированная ионная хроматограмма и МСМС-спектр *N*-[12-(2,3,4-три-*O*-ацетил- β -*D*-ксилопиранозил)индоло-[2,3-а]пирроло-[3,4-с]карбазол-5,7-дион-6-ил]пиридин-2-карбоксамида

Полученные данные о строении и происхождении примесей ЛХС-1269-Х и ЛХС-1269-У позволили провести оптимизацию технологии синтеза и очистки субстанции ЛХС-1269, благодаря чему содержание данных примесей в лабораторных образцах 4 и 5 снизилось.

4.4 Валидация методики определения действующего вещества в субстанции ЛХС-1269 методом ВЭЖХ

Для методики определения содержания основного вещества и примесей в его субстанции была проведена валидация.

4.4.1 Специфичность

При разработке хроматографической методики количественного определения необходимо учитывать возможное влияние растворителей, применяемых на пригодность хроматографической системы и искажение результаты анализа [7; 55].

Для определения специфичности методики 2,5 мл смеси ДМСО и ацетонитрила в соотношении 1:9 помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили до метки смесью вода - ацетонитрил 1:1 до объема 50 мл. Полученный раствор хроматографировали в условиях оптимизированной методики, описанной в разделе 4.3.1.

Далее по оптимизированной методике, описанной в разделе 4.3.1, готовили шесть растворов субстанции ЛХС-1269. Полученные растворы также хроматографировали. Хроматограммы субстанции сравнивали (Рисунок 52 Б) с хроматограммой растворителя (Рисунок 52 А) на наличие возможных помех от растворителя или подвижной и определяли возможные отклонения времени удерживания пика действующего вещества.

На основе сравнения полученных хроматограмм и статистической обработки результатов эксперимента (Таблица 20) следует вывод, что растворитель и подвижная фаза не влияют на результаты анализа.

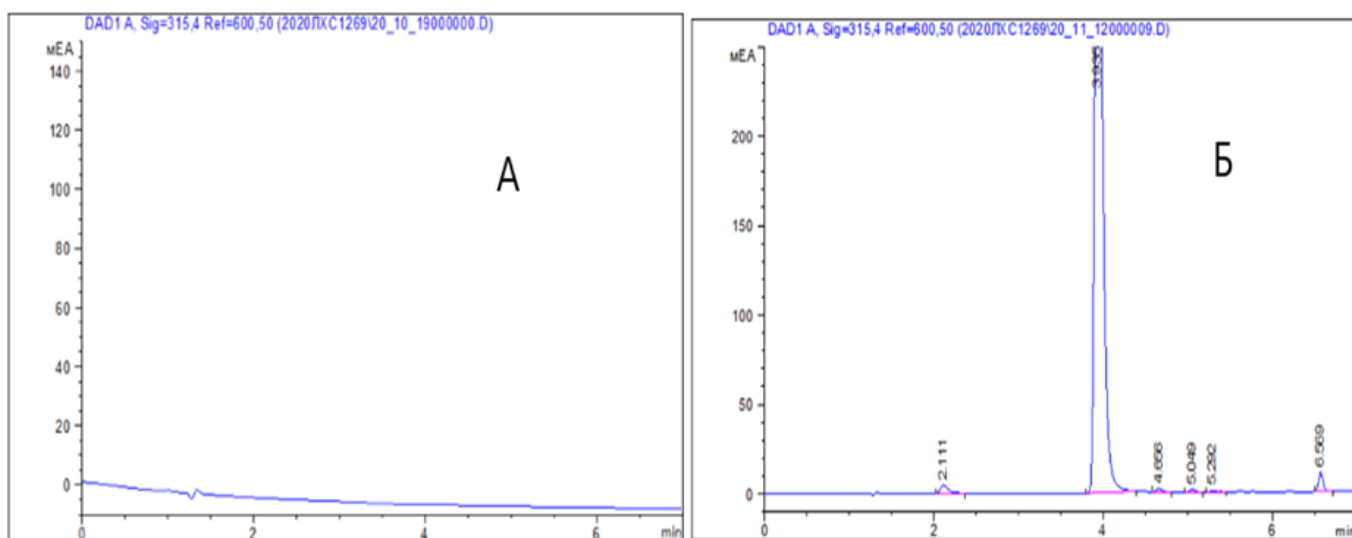


Рисунок 52 – Хроматограмма растворителя, применяемого при анализе и раствора субстанции ЛХС-1269

Таблица 20 – Времена удерживания, полученные в результате хроматографирования шести навесок субстанции ЛХС-1269

№	Навеска ЛХС -1269 (мг)	RT пика ЛХС-1269	Метрологические характеристики
1	12,300	3,932	$f = 5$ $\bar{x} = 3,94$ $S^2 = 0,000493$ $S = 0,022$ $P\% = 95$ $t(P;f) = 2,57$ $\Delta x = \pm 0,0233$ $\varepsilon\% = 0,591$
2	13,800	3,935	
3	12,500	3,912	
4	13,100	3,963	
5	13,300	3,973	
6	12,800	3,948	

Также на хроматограммах определялся коэффициент разрешения, для действующего вещества субстанции ЛХС-1269 (Рисунок 53).

Отчет Относительных Площадей с Характеристиками

Множитель : 1.0000
Разбавление: 1.0000
Применять Множитель & Разбавление к ISTD

Сигнал 1: DAD1 A, Sig=315,4 Ref=600,50

RetTime [мин]	k'	Площадь [мЕА*s]	Высота [мЕА]	Симм.	Ширина [мин]	Тарелки	Разре шение	Селектив ность
2.111	-	30.88893	4.82164	0.53	0.0911	2974	-	-
3.935	-	2808.51929	480.80667	0.60	0.0853	11783	12.15	1.86
4.656	-	8.61338	1.83090	0.70	0.0708	23940	5.42	1.18
5.049	-	6.91081	1.59733	0.73	0.0667	31771	3.35	1.08
5.292	-	5.12180	1.12108	0.59	0.0608	41927	2.25	1.05
6.569	-	40.24936	10.82638	0.82	0.0570	73481	12.73	1.24

*** Конец Отчета ***

Прибор 1 19.11.2020 6:39:16 Будько Стр. 1 из 1

Рисунок 53 – Коэффициенты разрешения для действующего вещества и примесей субстанции ЛХС-1269

Максимальное начение коэффициента разрешения составило 12,15, что значительно превышает минимальное значение коэффициента разрешения, равное 1,5.

Полученные данные подтверждают специфичность методики для подтверждения подлинности и количественного анализа субстанции ЛХС-1269. [16;110].

4.4.2 Линейность

Линейность предложенной методики определяли путем доказательства линейной зависимости между содержанием действующего вещества субстанции ЛХС-1269 в модельном растворе и величиной сигнала (площадью пика). В процессе валидации методики ее линейность подтверждали экспериментально путем измерения аналитических сигналов для пяти модельных смесей с различными концентрациями ЛХС-1269 в диапазоне от 80 до 120% от анализируемой концентрации [53]. Каждая модельная смесь анализировалась три раза. На основе средней площади пика для ряда определений для каждой концентрации проводилось построение и выведение уравнения регрессии вида

$y=a+bx$, также у полученного графика линейной зависимости определяли метрологические параметры линейной зависимости (Таблица 21).

Таблица 21 – Соотношение концентрации субстанции ЛХС-1269 и площади пика действующего вещества ЛХС-1269

№	Концентрация ЛХС-1269, мкг/мл	Средняя площадь пика действующего вещества ЛХС-1269, мЕА×S	Концентрация ЛХС-1269, %	Параметры линейной зависимости $y=bx+a$
1	37,17	1936,65	80	$f=3$ $x_{cp}=46,46$ $y_{cp}=2425,92$ $a=-35,172$ $b=52,698$ $t(Pf)=3,18$ $r = 0,9989$ $Sa=47,52$ $Sb=1,01$ $\Delta a=151,11$ $\Delta b=3,21$ $S^2_0=221,42$
2	41,82	2166,61	90	
3	46,46	2444,86	100	
4	51,11	2661,60	110	
5	55,76	2919,87	120	
Критерии приемлемости		$r \geq 0,995$	$ a < \Delta a$	Выполняются

Дополнительным подтверждением линейности методики является графическое изображение регрессионной прямой (рисунок 54).

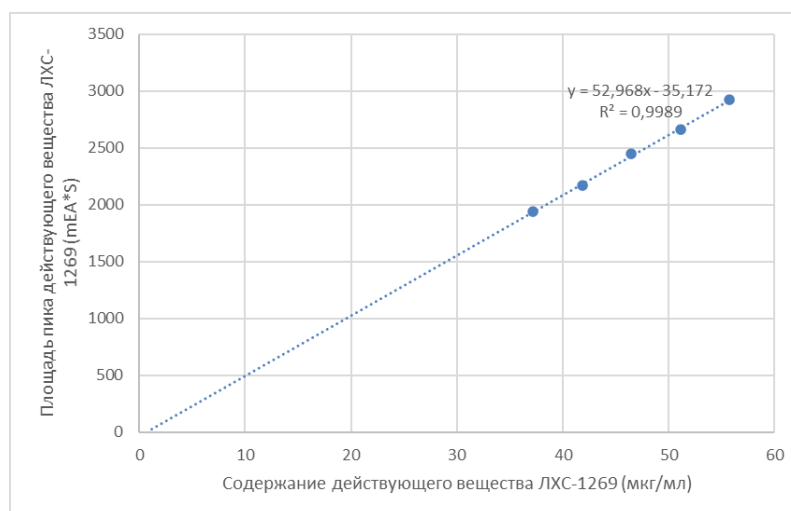


Рисунок 54 – График линейной зависимости площади пика ЛХС-1269 от его содержания в модельном растворе

На основании полученных данных можно сделать вывод, что уравнение регрессии для данной зависимости имеет вид $y=52,698x-35,512$. Также о достаточно тесной линейной связи между концентрацией ЛХС-1269 и площадью пика в диапазоне концентраций от 80 до 120% говорит рассчитанный коэффициент корреляции, значение которого составило 0,9989. На основании полученных данных методику можно считать линейной [16;110].

4.4.3 Пределы обнаружения

Используя параметры линейной зависимости по формулам (5) и (6) рассчитаны такие показатели, как предел обнаружения (ПО) и предел количественного определения (ПКО) для ЛХС-1269 в данной методике.

$$\text{ПО} = \frac{3,3 \times s_a}{b} = \frac{3,3 \times 47,52}{52,698} = 2,9757 \text{ мкг/мл} \quad (5)$$

$$\text{ПКО} = \frac{10 \times s_a}{b} = \frac{10 \times 47,52}{52,698} = 9,0174 \text{ мкг/мл} \quad (6)$$

4.4.4 Прецизионность

Для изучения сходимости аналитической методики сравнивали результаты, полученные в одной лаборатории, и использованием одного и того же хроматографа, одним и тем же исследователем, в короткий промежуток времени [54]. Испытание проводили на девяти навесках (Таблица 22) субстанции ЛХС-1269, взятых из одного лабораторного образца, чистотой 97,13%. На основе полученных средних площадей пиков каждого образца рассчитывался коэффициент соотношения (D) площади пика к навеске с учетом чистоты и содержания воды в образце субстанции. Расчет выполняли по формуле (7):

$$D = \frac{(((S \div m \div 100) \times (100 - W)) \div 100) \times P)}{100} \quad (7)$$

где: D – коэффициент соотношения

S - площадь пика ЛХС-1269

m - масса навески

W – содержание воды %

P - чистота субстанции в %

Результаты испытания предоставлены в таблице 23

Таблица 22 – Результаты испытания методики на сходимость

№	Масса навески ЛХС-1269 (мг)	Средняя площадь пика (mEA*S)	Значение D	Метрологические характеристики
1	1,0000	2444,86	2,272	$\mu = 2,278$ $f = 8$ $\bar{x} = 2,261$ $S^2 = 0,002$ $S = 0,044$ $P\% = 95\%$ $t(P;f) = 2,31$ $\Delta x_{cp} = \pm 0,034$ $t = 1,185$ $\varepsilon_{cp}\% = 1,487$
2	13,200	3136,10	2,208	
3	13,000	3135,22	2,241	
4	13,700	3361,47	2,280	
5	14,100	3578,49	2,358	
6	12,800	3056,81	2,219	
7	14,500	3521,34	2,257	
8	9,700	2364,92	2,266	
9	11,400	2753,67	2,245	
Критерий приемлемости	$S_{\bar{0}}, \% < 1,5$		$S_{\bar{0}}, \% = 0,64$	

Рассчитанный на основании экспериментальных данных коэффициент вариации составил менее 1,5%, что свидетельствует о незначительной изменчивости вариационного ряда и сходимости предложенной методики анализа в условиях повторяемости. Поэтому, на основании полученных данных методику можно считать валидной по сходимости.

Для определения промежуточной прецизионности в другой день проводили повторное испытание 9 навесок субстанции ЛХС-1269 того же лабораторного образца. Результаты испытания предоставлены в Таблице 23.

Таблица 23 – Результаты испытания методики на промежуточную прецизионность

№	Масса навеки ЛХС-1269 (мг)	Средняя площадь пика (mEA*S)	Значение D	Метрологические характеристики
1	12,600	3126,14	2,306	$\mu = 2,278$ $f = 8$ $\bar{x} = 2,294$ $S^2 = 0,002$ $S = 0,039$ $P\% = 95$ $t(P;f) = 2,31$ $\Delta x_{cp} = \pm 0,029$ $t = 1,220$ $\varepsilon_{cp}\% = 1,303$
2	11,700	2862,91	2,274	
3	11,200	2805,25	2,327	
4	12,800	3228,69	2,344	
5	10,300	2487,56	2,244	
6	10,200	2483,22	2,262	
7	11,800	2882,57	2,270	
8	12,600	3072,37	2,266	
9	12,500	3160,11	2,349	
Критерий приемлемости	$S_{\bar{0}}, \% < 1,5$		$S_{\bar{0}}, \% = 0,56$	

Полученные метрологические характеристики сравнивали с метрологическими характеристиками, полученными при испытании на сходимость (Таблица 24).

На основе двух полученных выборок рассчитан коэффициент Стьюдента, равный 1,60. Полученный коэффициент был меньше табличного значения ($P=95\%$; $f=16$) = 2,12, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки измерений [16;110]. Таким образом, установлена промежуточная прецизионность методики.

Таблица 24 – Сравнение метрологических характеристик испытаний на сходимость и промежуточную прецизионность

Сходимость	Промежуточная прецизионность
$\mu = 2,278$	$\mu = 2,278$
$f = 8$	$f = 8$
$\bar{x} = 2,261$	$\bar{x} = 2,294$
$S^2 = 0,002$	$S^2 = 0,002$
$S = 0,044$	$S = 0,039$
$P\% = 95\%$	$P\% = 95$
$t(P;f) = 2,31$	$t(P;f) = 2,31$
$\Delta x_{cp} = \pm 0,034$	$\Delta x_{cp} = \pm 0,029$
$t = 1,185$	$t = 1,220$
$\varepsilon_{cp}\% = 1,487$	$\varepsilon_{cp}\% = 1,303$

4.4.5 Правильность

Для доказательства правильности методики количественного анализа субстанции ЛХС-1269 готовили трипликаты модельных смесей трех концентраций ЛХС-1269: 80, 100 и 120%. Результаты хроматографии оценивали путем сравнения полученного результата (отклика) ЛХС-1269 с ожидаемым значением величины. Оценку правильности методики на основе девяти результатов проводили путем расчета процента обнаружения, стандартного отклонения, коэффициента вариации, доверительного интервала среднего значения ($P=95\%$) и относительной погрешности среднего результата (Таблица 25).

Таблица 25 – Результаты испытания методики на правильность

№	Полученная концентрация действующего вещества ЛХС-1269 от рабочей (%)	Содержание ЛХС-1269 в исходной навеске (мг)	Площадь пика ЛХС-1269	Найдено ЛХС-1269 (мг)	Отклик (%)	Метрологические характеристики
1	80	8,4007	1939,09	8,42364	100,27	$\mu = 100$ $f = 8$ $\bar{x} = 100,18$ $S^2 = 1,107$ $S = 1,05$ $P\% = 95$ $t(P;f) = 2,31$ $\Delta x_{cp} = \pm 0,69$ $t = 1,15$ $\varepsilon_{cp}\% = 0,69$
2		7,7316	1935,12	7,73714	100,07	
3		7,8803	1960,55	7,98771	101,36	
4	100	9,9433	2454,25	10,0577	101,15	
5		9,3857	2469,78	9,5529	101,78	
6		9,5716	2428,29	9,5808	100,10	
7	120	12,0435	2914,24	12,0275	99,87	
8		11,5974	2902,52	11,5360	99,47	
9		11,8204	2890,25	11,7088	99,06	

Согласно экспериментальным данным разработанная методика анализа субстанции ЛХС-1269 методом ВЭЖХ может считаться правильной, так как отклонение от среднего значения, коэффициент Стьюдента и относительная погрешность среднего результата укладываются в нормы. Следовательно, предложенная методика может считаться правильной [16;110].

На основе экспериментов по валидации методики определения содержания ЛХС-1269 в его фармацевтической субстанции данная методика может считаться валидной.

4.5 Валидация методики определения примеси ЛХС-1269-У в субстанции ЛХС-1269 методом ВЭЖХ

Поскольку содержание примеси ЛХС-1269-У превышает 1%, в методике количественного анализа субстанции ЛХС-1269 была также проведена валидация определение примеси ЛХС-1269-У.

4.5.1 Специфичность

Специфичность методики подтверждали аналогично методике, описанной в разделе 4.4.1.

На основе сравнения полученных хроматограмм (Рисунки 55) и статистической обработки результатов эксперимента (Таблица 26) следует вывод, что растворитель и подвижная фаза не искажают площадь пика и время удерживания примеси ЛХС-1269-У.

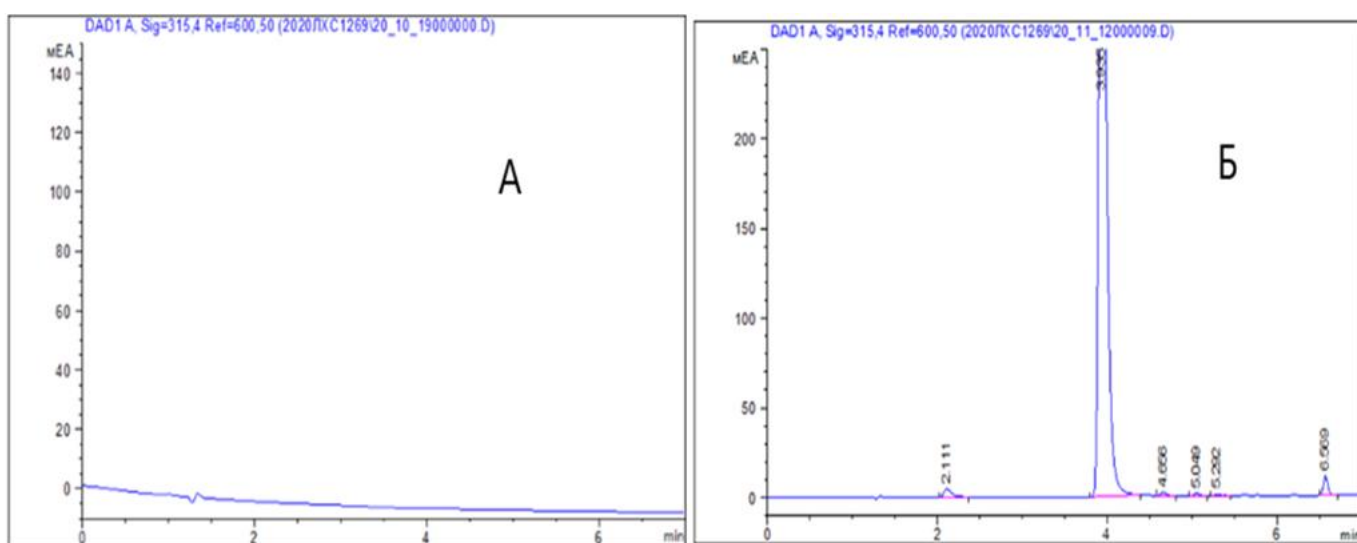


Рисунок 55 – Хроматограмма растворителя, применяемого при анализе субстанции

Таблица 26 – Времена удерживания примеси ЛХС-1269-У, полученные в результате хроматографирования субстанции ЛХС-1269

№	Навеска субстанции ЛХС -1269, мг	Rt пика примеси ЛХС-1269-У, мин.	Метрологические характеристики
1	12,300	6,574	$f = 5$ $\bar{x} = 6,569$ $S^2 = 7,02 \times 10^{-5}$ $S = 0,008$ $P\% = 95$ $t(P;f) = 2,57$ $\Delta x = \pm 0,009$ $\varepsilon\% = 0,138$
2	13,800	6,577	
3	12,500	6,571	
4	13,100	6,57	
5	13,300	6,553	
6	12,800	6,57	

Коэффициент разрешения для примеси ЛХС-1269-У составил 12,73 (Рисунок 56).

Отчет Относительных Площадей с Характеристиками

Множитель : 1.0000
Разбавление: 1.0000
Применять Множитель & Разбавление к ISTD

Сигнал 1: DAD1 A, Sig=315,4 Ref=600,50

RetTime [мин]	k'	Площадь [мЕА*s]	Высота [мЕА]	Симм.	Ширина [мин]	Тарелки	Разре шение	Селектив ность
2.111	-	30.88893	4.82164	0.53	0.0911	2974	-	-
3.935	-	2808.51929	480.80667	0.60	0.0853	11783	12.15	1.86
4.656	-	8.61338	1.83090	0.70	0.0708	23940	5.42	1.18
5.049	-	6.91081	1.59733	0.73	0.0667	31771	3.35	1.08
5.292	-	5.12180	1.12108	0.59	0.0608	41927	2.25	1.05
6.569	-	40.24936	10.82638	0.82	0.0570	73481	12.73	1.24

*** Конец Отчета ***

Прибор 1 19.11.2020 6:39:16 Бутько Стр. 1 из 1

Рисунок 56 – Коэффициенты разрешения для основного вещества и примесей субстанции ЛХС-1269

Исходя из результатов статистического анализа, вышеописанная методика является специфичной для примеси ЛХС-1269-У.

4.5.2 Линейность

Линейность предложенной методики анализа определяли путем доказательства линейной зависимости между содержанием примеси ЛХС-1269-У 1,39% в модельном растворе и величиной сигнала (площадью пика). Аналогично действующему веществу, линейность методики для примеси подтверждалась путем измерения аналитических сигналов для пяти модельных смесей с различными концентрациями примеси ЛХС-1269-У в диапазоне от 80 до 120% от анализируемой концентрации. На основе средней площади пика из трех определений для каждой концентрации строили график и выводили уравнение регрессии. Для полученного графика линейной зависимости проводили обработку данных параметров линейной зависимости (Таблица 27).

Таблица 27 – Соотношение концентрации примеси ЛХС-1269-У и площади его пика

№	Концентрация 1269-У мкг/мкл	Средняя площадь пика примеси ЛХС-1269-У мЕАС	Концентрация примеси 1269-У %	Параметры линейной зависимости $y=bx+a$
1	0,535	27,747	80	$f=3$ $x_{ср}= 0,669$ $у_{ср}= 34,872$ $a= -1,156$ $b= 53,88$ $t(Pf)= 3,18$ $r = 0,999$ $Sa=0,65$ $Sb= 0,96$ $\Delta a=2,067$ $\Delta b=3,053$ $S^2\sigma=0,041$
2	0,602	31,045	90	
3	0,669	35,104	100	
4	0,736	38,362	110	
5	0,802	42,103	120	
Критерии приемлемости		$r \geq 0,995$	$ a < \Delta A$	Выполняются

Графическое изображение регрессионной является дополнительным подтверждением линейности методики (Рисунок 57).

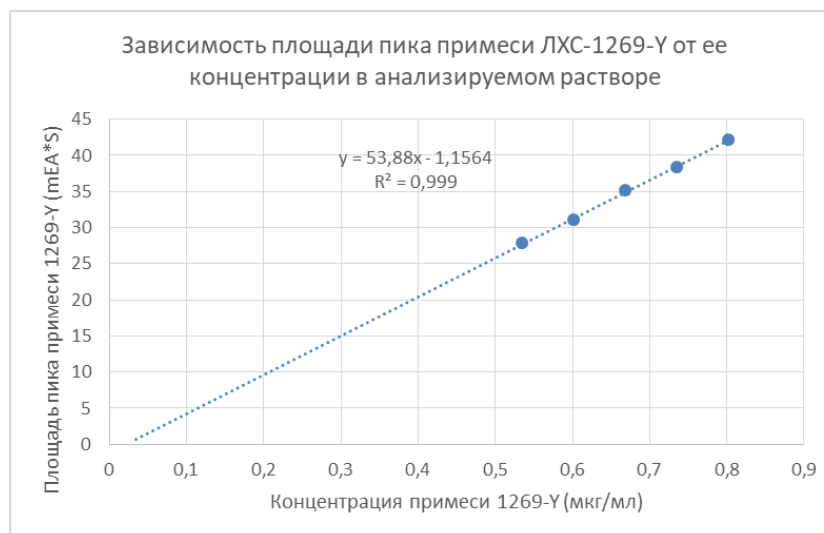


Рисунок 57 – Зависимость площади пика примеси ЛХС-1269-У от ее содержания в модельном растворе

Уравнение регрессии для данной зависимости имеет вид $y=53,88x-1,1564$. Значение коэффициента корреляции, составило 0,999%. На основании полученных данных методика может считаться линейной.

4.5.3 Пределы обнаружения

Используя параметры линейной зависимости формулы (5) и (6) для примеси ЛХС-1269-У были рассчитаны ПО и ПКО. Для ЛХС-1269-У значение ПО составило 0,04 мкг/мл, а ПКО составил 0,12 мкг/мл.

4.5.4 Прецизионность

Испытание на прецизионность проводили на девяти навесках (таблица 28) субстанции ЛХС-1269 взятых из одного лабораторного образца субстанции с содержанием примеси ЛХС-1269-У 1,39%. По аналогии с разделом 4.4.4 для примеси рассчитывали соотношение D по формуле (7). Основным различием в расчетах составило то, что за значение S брали площадь пика примеси ЛХС-1269-У, а за значение P брали содержание этой примеси в субстанции.

Таблица 28 – Результаты испытания методики на сходимость для примеси ЛХС-1269-У

№	Масса навески ЛХС-1269 (мг)	Средняя площадь пика ЛХС-1269-У (mEA*S)	Значение D	Метрологические характеристики
1	1,0000	35,10429	0,468	$\mu = 0,471$ $f = 8$ $\bar{x} = 0,469$ $S^2 = 9,11 \times 10^{-5}$ $S = 0,01$ $P\% = 95$ $t_{(P;f)} = 2,31$ $\Delta x_{cp} = \pm 0,007$ $t = 0,50$ $\varepsilon_{cp}\% = 1,57$
2	13,200	45,3332	0,458	
3	13,000	45,49763	0,467	
4	13,700	48,39091	0,471	
5	14,100	51,99454	0,492	
6	12,800	44,30034	0,462	
7	14,500	51,20429	0,471	
8	9,700	33,88826	0,466	
9	11,400	39,82772	0,466	
Критерий приемлемости	$S_{\bar{0}}, \% < 1,5$		$S_{\bar{0}}, \% = 0,68$	

Результаты определения промежуточной прецизионности представлены в Таблице 29.

Таблица 29 – Результаты испытания методики на промежуточную прецизионность для примеси ЛХС-1269-У

№	Масса навески ЛХС-1269 (мг)	Средняя площадь пика ЛХС-1269-У (mEA*S)	Значение D	Метрологические характеристики
1	12,600	44,928	0,476	$\mu = 0,471$ $f = 8$ $\bar{x} = 0,472$ $S^2 = 0,0001$ $S = 0,010$ $P\% = 95$ $t_{(P;f)} = 2,31$ $\Delta x_{cp} = \pm 0,008$ $t = 0,26$ $\varepsilon_{cp}\% = 1,66$
2	11,700	41,212	0,470	
3	11,200	40,222	0,479	
4	12,800	46,428	0,484	
5	10,300	35,540	0,460	
6	10,200	35,668	0,467	
7	11,800	40,960	0,463	
8	12,600	43,369	0,459	
9	12,500	45,568	0,486	
Критерий приемлемости	$S_{\bar{0}}, \% < 1,5$		$S_{\bar{0}}, \% = 0,72$	

Полученные метрологические характеристики сравнивались с метрологическими характеристиками, полученными при испытании на сходимость (Таблица 30).

Таблица 30 – Сравнение метрологических характеристик испытаний на сходимость и промежуточную прецизионность для примеси ЛХС-1269-У

Сходимость	Промежуточная прецизионность
$\mu = 0,471$	$\mu = 0,471$
$f = 8$	$f = 8$
$\bar{x} = 0,469$	$\bar{x} = 0,472$
$S^2 = 9,11 \times 10^{-5}$	$S^2 = 0,0001$
$S = 0,01$	$S = 0,01$
$P\% = 95$	$P\% = 95$
$t_{(P;f)} = 2,31$	$t_{(P;f)} = 2,31$
$\Delta x_{cp} = \pm 0,007$	$\Delta x_{cp} = \pm 0,008$
$t = 0,50$	$t = 0,26$
$\varepsilon_{cp}\% = 1,57$	$\varepsilon_{cp}\% = 1,66$

Рассчитанный на основе двух полученных выборок коэффициент Стьюдента, равнялся 0,67, что не превышает табличного значения при условиях ($P=95\%$; $f=16$) = 2,12, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки измерений. Таким образом, у методики подтверждена промежуточная прецизионность.

4.5.5 Правильность

Правильность методики подтверждали путем сравнения полученного отклика примеси ЛХС-1269-У с ожидаемым значением величины в трипликатах с содержанием примеси 80, 100 и 120% от анализируемой концентрации. Оценку правильности методики проводили путем расчета стандартного отклонения, коэффициента вариации, доверительного интервала среднего значения ($P=95\%$) и относительной погрешности среднего результата (Таблица 31). Так как данные значения укладываются в нормы, методика может считаться правильной.

Таблица 31 – Результаты испытания методики на правильность

№	Полученная концентрация действующего вещества ЛХС-1269 от рабочей (%)	Содержание ЛХС-1269-У в исходной навеске (мг)	Площадь пика 1269-У	Найдено 1269-У (мг)	Отклик (%)	Метрологические характеристики
1	80	0,0151	28,753	0,0157	103,99	$\mu = 100$ $f = 8$ $\bar{x} = 101,06$ $S^2 = 4,313$ $S = 2,077$ $P\% = 95$ $t_{(P;f)} = 2,31$ $\Delta x_{cp} = \pm 1,599$ $t = 1,54$ $\epsilon_{cp}\% = 1,58$
2		0,0139	28,005	0,0141	101,40	
3		0,0141	28,794	0,0147	104,14	
4	100	0,0143	35,078	0,0144	100,80	
5		0,0135	35,526	0,0138	102,04	
6		0,0137	34,597	0,0137	99,46	
7	120	0,0144	41,113	0,0141	97,99	
8		0,0139	41,738	0,0138	99,43	
9		0,0141	42,122	0,0142	100,33	

На основании экспериментальных результатов, методика количественного анализа субстанции ЛХС-1269 может считаться валидной для примеси ЛХС-1269-У.

4.6 Разработка проекта спецификации качества для фармацевтической субстанции ЛХС-1269

Основываясь полученных в ходе исследования образцов субстанции ЛХС-1269 характеристиках, составлен проект спецификации на фармацевтическую субстанцию ЛХС-1269 (Таблица 32).

Таблица 32 – Проект спецификации на фармацевтическую субстанцию ЛХС-1269

ПОКАЗАТЕЛИ	МЕТОДЫ	НОРМЫ
Описание	Визуальный	Аморфный порошок желтого цвета, без запаха
Растворимость	ГФ XIV	Растворим в ДМФА; умеренно растворим в ДМСО; очень мало растворим в спирте этиловом 96 %, практически нерастворим в воде
Подлинность	Спектрофотометрия	УФ-спектр 0,0004 % раствора ЛХС-1269 в ДМФА в области от 200 нм до 500 нм должен иметь максимумы поглощения при длинах волн 286 ± 2 нм и 319 ± 2 нм, слабоинтенсивный максимум при 413 ± 2 нм; плечо при 308 ± 2 нм; плечо при 337 ± 2 нм и минимумы при 278 ± 2 нм, 295 ± 2 нм и 375 ± 2 нм.
	ИК-спектрометрия	ИК-спектр в области от 4000 см^{-1} до 400 см^{-1} должен полностью совпадать с рисунком ИК-спектра, приведенном в проекте НД
	ВЭЖХ	Время удерживания пика ЛХС-1269 должно быть 3,9- 4,0 мин.
Удельный показатель поглощения	ГФ XIV	От 1040 до 1100 в пересчете на сухое вещество (ДМФА, 320 ± 2 нм)
Удельное вращение	ГФ XIV	От $+58$ до $+60^\circ$
Прозрачность раствора	ГФ XIV	Раствор 0,004 г ЛХС-1269 в 100 мл ДМФА должен быть прозрачным
Родственные примеси	ВЭЖХ	Общая сумма примесей – не более 3,00 % ЛХС-1269-Х – не более 0,90% ЛХС-1269-У – не более 1,50 % Любая единичная неидентифицированная примесь – не более 1,00 %
Сульфатная зола и тяжелые металлы	ГФ XIV	Сульфатная зола - не более 0,10 %; тяжелые металлы - не более 0,001 %
Вода (по методу К.Фишера)	ГФ XIV	Не более 2,5 %
Количественное определение	ВЭЖХ	Не менее 97,00 %
Микробиологическая чистота	ГФ XIV	Категория 1.2 Б
Упаковка	По 100 или 200 г в банки оранжевого стекла с навинчиваемыми пластмассовыми крышкой и прокладками из полиэтилена. На банки наклеивают этикетки. Банки обертывают бумагой мешочной, обвязывают нитками, наклеивают такую же этикетку, после чего помещают в пакеты полиэтиленовые и запаивают.	
Маркировка	В соответствии с НД	
Назначение	Для приготовления инъекционных лекарственных форм	

4.7 Определение сроков годности фармацевтической субстанции ЛХС-1269

Исследование стабильности для субстанции ЛХС-1269 проводили при хранении образцов субстанций в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°C (в холодильной камере). Образцы хранили в банках из темного стекла, укупоренных навинчиваемыми пластиковыми крышками. Контроль качества проводили по критериям, описанным в Таблице 33.

На основе полученных данных установлено, что при хранении образцов субстанции ЛХС-1269 в течение 2,5 лет в указанных выше условиях значимых изменений качества субстанции не происходит. Это позволяет установить для них срок годности в 2 года [40].

Таблица 33 – Результаты исследования стабильности субстанции ЛХС-1269

Образец №	Описание	Растворимость	Прозрачность раствора	Удельное вращение	Вода, %	Удельный показатель поглощения	Количество определенное	Общая сумма примесей %	Идентифицированные примеси %	Срок хранения
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
НОРМЫ	Аморфный порошок желтого цвета, без запаха	1: 20 в ДМСО ; 1: 40 в ДМФА; 1: 9000 96% этанол; более 1: 10000 в воде	1% р-ры в ДМФА и ДМСО прозрачны	От +58 до + 60 °	Не более 2,5 %	1070±30	Не менее 97,00 %	– не более 3,0	ЛХС-1269-Х – не более 0,90 ЛХС-1269-У – не более 1,50	-
1	-«-	-«-	-«-	+59	2,50	1079	97,80	2,2	0,80 1,39	Входной контроль
	-«-	-«-	-«-	+60	2,58	1077	97,54	2,46	0,80 1,40	3 месяца
	-«-	-«-	-«-	+60	2,65	1082	97,39	2,61	0,83 1,40	6 месяцев
	-«-	-«-	-«-	+60	2,77	1080	97,22	2,78	0,86 1,39	9 месяцев
	-«-	-«-	-«-	+60	2,90	1079	97,04	2,96	0,86 1,40	1 год
	-«-	-«-	-«-	+60	3,50	1073	97,06	2,94	0,84 1,39	1,5 года
	-«-	-«-	-«-	+60	4,10	1069	97,02	2,98	0,85 1,42	2 года
	-«-	-«-	-«-	+60	4,80	1065	97,03	3,61	0,82 1,46	2,5 года

Продолжение Таблицы 33

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
2	-«-	-«-	-«-	+60	2,40	1069	98,10	1,90	0,85 1,43	Входной контроль
	-«-	-«-	-«-	+60	2,50	1065	98,03	1,97	0,85 1,42	3 месяца
	-«-	-«-	-«-	+60	2,61	1067	97,68	2,32	0,87 1,40	6 месяцев
	-«-	-«-	-«-	+60	2,73	1063	97,26	2,74	0,86 1,42	9 месяцев
	-«-	-«-	-«-	+59	2,85	1065	97,04	2,96	0,88 1,42	1 год
	-«-	-«-	-«-	+60	3,35	1060	97,07	2,93	0,88 1,40	1,5 года
	-«-	-«-	-«-	+60	4,13	1064	97,04	2,96	0,88 1,42	2 года
	-«-	-«-	-«-	+60	4,6	1060	96,88	3,12	0,88 1,40	2,5 года

Продолжение Таблицы 33

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
3	-«-	-«-	-«-	+59	2,01	1073	97,6	2,4	0,29 1,16	Входной контроль
	-«-	-«-	-«-	+60	2,14	1067	97,89	2,11	0,30 1,16	3 месяца
	-«-	-«-	-«-	+60	2,27	1070	97,93	2,07	0,28 1,17	6 месяцев
	-«-	-«-	-«-	+60	2,41	1065	97,90	2,10	0,29 1,16	9 месяцев
	-«-	-«-	-«-	+60	2,56	1063	97,95	2,05	0,34 1,16	1 год
	-«-	-«-	-«-	+60	3,08	1064	97,88	2,12	0,38 1,17	1,5 года
	-«-	-«-	-«-	+60	3,63	1063	97,80	2,19	0,43 1,16	2 года
	-«-	-«-	-«-	+60	4,10	1060	97,79	2,21	0,43 1,16	2,5 года

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. Исследованы физико-химические свойства субстанции ЛХС-1269: описание, растворимость, удельный угол вращения, органически связанный хлор, сульфатная зола и тяжелые металлы, потеря в массе при высушивании, содержание воды.

2. Исследованы спектральные характеристики ЛХС-1208 в ¹H-ЯМР, ИК, УФ и МСМС-спектрах высокого разрешения. Установлена возможность использования указанных методов для подтверждения подлинности и количественного определения субстанции ЛХС-1269.

3. Разработана и валидирована методика определения действующего вещества в субстанции ЛХС-1269 методом ВЭЖХ.

4. Идентифицированы две родственные примеси в субстанции ЛХС-1269, получившие наименования ЛХС-1269-Х и ЛХС-1269-У. На основе полученных данных проведена оптимизация синтеза ЛХС-1269, позволившая значительно уменьшить содержание примесей.

6. Разработана и валидирована методика количественного определения примеси ЛХС-1269-У методом ВЭЖХ.

7. На основе полученных данных разработаны показатели качества для фармацевтической субстанции ЛХС-1269.

8. Проведено исследование стабильности и установлен срок годности для субстанции ЛХС-1269, который составил 2 года при хранении в сухом защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°C (в холодильной камере).

9. Установлены нормы качества для субстанции ЛХС-1269 и разработан проект НД по качеству фармацевтической субстанции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для дальнейшего продвижения фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269 в практическую онкологию проведено исследование по их стандартизации и разработке аналитических методик для контроля качества. В ходе работы определены физико-химические свойства, спектральные и хроматографические характеристики ЛХС-1208 и ЛХС-1269. В субстанции ЛХС-1269 идентифицированы и количественно определены две родственные примеси. Разработаны методики для подтверждения подлинности, количественного определения и определения родственных примесей фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269. Подтверждена возможность использования метода ВЭЖХ для определения ЛХС-1208 в биологических жидкостях при фармакокинетических исследованиях. Валидирована методика количественного определения действующего вещества и родственной примеси в субстанции ЛХС-1269. Изучение стабильности субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269 показало, что основные показатели их качества оставались неизменными на протяжении 2,5 лет при хранении в холодильной камере, что позволяет установить для них срок годности в 2 года. На основании полученных экспериментальных данных разработаны проекты нормативной документации по контролю качества фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Проведено комплексное исследование основных физико-химических свойств фармацевтических субстанций производных *N*-гликозидов индоло[2,3-*a*]карбазола ЛХС-1208 и ЛХС-1269. Получены и интерпретированы ¹H-ЯМР, ИК-, УФ- и тандемные масс-спектры высокого разрешения, подтвердившие строение впервые синтезированных соединений.

2. Для подтверждения подлинности и контроля качества фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269 разработаны аналитические методики с применением спектральных методов анализа (ИК-спектрометрия, УФ-спектрофотометрии). Установлено, что величина удельного вращения составляет от +58° до + 61° для ЛХС-1208 и от +58° до + 60° для ЛХС-1269. Показано, что содержание сульфатной золы в субстанции ЛХС-1208 не превышает 0,10%, а ЛХС-1269 – не более 0,05%, содержание тяжелых металлов в обеих субстанциях – менее 0,001%. Методом К. Фишера установлено, что ЛХС-1208 содержит не более 1,0%, а субстанция ЛХС-1269 – не более 2,5% воды.

3. Для подтверждения подлинности и количественного определения действующего вещества и возможных примесей использовали метод ВЭЖХ в градиентном режиме элюирования: в качестве подвижной фазы применяли смеси воды и ацетонитрила с добавлением 0,1% трифторуксусной кислоты; оптимальная концентрация ЛХС-1208 и ЛХС-1269 в анализируемых растворах составила 200 мкг/мл и 50 мкг/мл соответственно, Подобранные условия обеспечили высокие значения коэффициентов разрешения между пиками действующего вещества и примесей (не менее 2,50 для ЛХС-1208 и не менее 2,25 для ЛХС-1269) при температуре хроматографической колонки 40°C. Длина волны (315±5) нм выбрана, как подходящая для одновременного детектирования действующих веществ и примесей.

4. На основе определенных хроматографических характеристик разработана методика количественного определения действующего вещества в субстанции

ЛХС-1208 методом ВЭЖХ. Содержание действующего вещества в анализированных образцах составляло не менее 97%. Показана возможность использования разработанной методики для определения ЛХС-1208 в биологических жидкостях в фармакокинетических исследованиях. Установлено, что ЛХС-1208 в неизменном виде определяется в плазме крови и моче мышей.

5. С применением методов ВЭЖХ-МСМС и направленного встречного синтеза в субстанции ЛХС-1269 идентифицированы две примеси, являющиеся родственными ЛХС-1269 соединениями. Разработана методика количественного определения действующего вещества и родственной примеси ЛХС-1269-У в фармацевтической субстанции ЛХС-1269 методом ВЭЖХ. Чистота субстанции ЛХС-1269 составляла не менее 97%, а содержание примесей ЛХС-1269-Х и ЛХС-1269-У 0,8 и 1,5%, соответственно. Высокая чувствительность (не менее 2,9757 мкг/мл для ЛХС-1269 и не менее 0,04 мкг/мл для примеси ЛХС-1269-У) и селективность разработанной методики подтверждена валидацией.

6. По результатам изучения стабильности фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269 при хранении образцов в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°C (в холодильной камере) доказано, что при хранении в течение 2,5 лет значимых изменений показателей качества не происходит. Это позволяет установить и обосновать срок их годности – 2 года.

7. Определены нормы качества для ЛХС-1208 и ЛХС-1269 как фармацевтических субстанций и разработаны проекты нормативной документации (спецификации по качеству) для фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты проведенных исследований рекомендуется применять при контроле качества фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269, а также при разработке и производстве лекарственных форм на их основе.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Разработанные проекты нормативной документации по контролю качества фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и ЛХС-1269 могут быть использованы как основа для разработки методик контроля качества других соединений – производных индоло[2,3-а]карбазола. Образцы примесей субстанции ЛХС-1269, полученные направленным встречным синтезом, и образцы субстанции, полученные после оптимизации синтеза, в дальнейшем могут быть охарактеризованы в качестве стандартных образцов и применены при контроле качества фармацевтической субстанции ЛХС-1269.

Методика выделения ЛХС-1208 из биологических жидкостей может быть применена для исследований доклинической фармакокинетики других производных индоло[2,3-а]карбазола.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность:

научным руководителям Решетняку В.Ю. и Шпрах З.С. за оказанную поддержку и ценные рекомендации;

сотрудникам кафедры химии Сеченовского Университета Нестеровой О.В., Селивановой И.А. и Белобородову В.Л. за консультации;

сотрудникам лаборатории химико-фармацевтического анализа ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России Ярцевой И.В. и Игнатъевой Е.В. за помощь и консультацию в проведении физико-химических исследований;

сотрудникам лаборатории химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России Гусеву Д.В., Эктовой Л.В., Ереминой В.А. и Мироновой М.В. за помощь и консультацию в синтезе образцов сравнения для идентификации примесей и составлении иллюстративного материала;

научному сотруднику лаборатории фармакологии и токсикологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России Будько А.П. за помощь в проведении хроматографических исследований.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ВАК – Высшая аттестационная комиссия
- ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГФ XIV – Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания
- Да – дальтон
- ДМСО – диметилсульфоксид
- ДМФА – диметилформамид
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИК – инфракрасный
- ЛС – лекарственное средство
- М.д. – миллионные доли
- МСМС-спектр – тандемный масс-спектр
- ОФС – общая фармакопейная статья
- ПФ – подвижная фаза
- ТСХ – тонкослойная хроматография
- УФ – ультрафиолетовый
- ЯМР – ядерный магнитный резонанс
- Ас – ацетильная группа
- Ar – ароматическая группа
- Ara – арабиноза
- As – ассиметричные колебания
- Bn – бензильная группа
- DEAD – диэтиловый эфир азодикарбоновой кислоты
- ^1H – протон
- IDA – скрининговый режим
- KBr – Калия бромид
- Me – метильная группа
- Psi – фунт на квадратный дюйм

Pу – пиридин

RT – время удерживания

S – симметричные колебания

THF – тетрагидрофуран

Xyl – ксилоза

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анализ производных индоло[2,3-а]карбазола, обладающих противоопухолевым действием методом ИК-спектроскопии. / Д.А. Козин, М.В. Миронова, О.В. Горюнова [и др.] // Первая всероссийская школа по медицинской химии для молодых ученых MEDCHEMSCHOOL2021 : Тезисы докладов, Новосибирск, 04–09 июля 2021 года. – Новосибирск: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук (НИОХ СО РАН), 2021.– С. 87.
2. Бахшиев, Н.Г. Введение в молекулярную спектроскопию: учеб. пособие / Н.Г. Бахшиев. – Л.: ЛГУ, 1987. – 216 с
3. Беккер, Ю. Спектроскопия / Ю. Беккер. – Москва : Техносфера, 2021.– 528 с.
4. Беккер, Ю. Хроматография. Инструментальная аналитика: методы хроматографии и капиллярного электрофореза / Ю. Беккер. – Москва : Техносфера, 2009. – 472 С.
5. Берштейн, И.Я. Спектрофотометрический анализ в органической химии / И.Я. Берштейн, Ю.Л. Каминский. – Ленинград : Химия, 1986. – 200 С.
6. Булатов, М.И. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа / М.И. Булатов, И.П. Калинин. – Ленинград : Химия, 1986. – 432 С.
7. Валидация аналитических методик для производителей лекарств: Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств / Под редакцией В.В. Береговых – М.: Литтерра, 2008.
8. Влияние химической структуры производных N-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов на противоопухолевую активность. / М.П. Киселева, В.С. Покровский, Л.М. Борисова [и др.] // Российский

биотерапевтический журнал. – 2019. – Т.18. – №2. – С. 32–39. DOI:10.17650/1726-9784-2019-18-2-32-39

9. Гольдберг, Ю. Ш. Избранные главы межфазного катализа / Ю. Ш. Гольдберг. – Рига : Зинатне, 1989. – 553 С.

10. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV. – М., 2017.

11. Идентификация примесей в фармацевтической субстанции ЛХС-1269 методом ВЭЖХ-МСМС / Д.А. Козин, З.С. Шпрах, А.П. Будько [и др.] // Медико-фармацевтический журнал "Пульс". 2023. – Т. 25. – №1. – С. 78-82.

12. Идентификация примеси в фармацевтической субстанции ЛХС-1269 методом ВЭЖХ-МСМС / Д.А. Козин, З.С. Шпрах, А.П. Будько [и др.] // MedChem-Russia 2021. 5-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2021» : Сборник тезисов 5-ой Российской конференции по медицинской химии с международным участием. – Т. 2. – Волгоград: Волгоград, 2022 – С. 35. DOI: 10.19163/MedChemRussia2021-2022-35

13. Изучение противоопухолевой активности N-гликозидов замещенных индоло[2,3-а]карбазолов / З.С. Смирнова, И.Ю. Кубасова, Т.Д. Миникер [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т.3. – №2. – С.34–35.

14. Изучение связи структуры и противоопухолевой активности в ряду N-гликозидов, производных индоло[2,3-а]карбазола / З.С. Смирнова, И.Ю. Кубасова, Л.М. Борисова [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т.5. – №1. – С.20.

15. Каприн А.Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2021 году / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой – Москва : МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022. – 239 с.

16. Козин, Д. А. Валидация методики определения действующего вещества в фармацевтической субстанции препарата ЛХС-1269 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / Д. А. Козин, М.В. Миронова //

Фундаментальная наука и клиническая медицина : материалы научной конференции, Санкт-Петербург, 24 апреля 2021 года. – Санкт-Петербург: Общество с ограниченной ответственностью Издательский дом «Сциентиа», 2021. – С. 667–668.

17. Козин, Д. А. Определение содержания действующего вещества в субстанции препарата ЛХС-1269 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. / Д.А. Козин // Сборник тезисов XV Международной (XXIV Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. Москва: ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. 2020. – С. 124.

18. Корреляция цитотоксической и противоопухолевой активности в отношении лейкозов в ряду N-гликозилированных производных индоло[2,3-а]карбазола / З.С. Смирнова, И.Ю. Кубасова, Л.М. Борисова, [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т.6. – №1. – С.50–51.

19. Мирошниченко, И.И. Организация фармакокинетических исследований / И.И. Мирошниченко, О.Ю. Кравцова // Фармакокинетика и Фармакодинамика. – 2021. – №3. – С. 12-19. DOI: 10.37489/2587-7836-2021-3-12-19

20. Мхитарян, В.С. Теория вероятностей и математическая статистика: учеб. пособие / В.С. Мхитарян, В.Ф. Шишов, А.Ю. Козлов. – Москва : Академия, 2012. – 336 с.

21. Определение ЛХС-1208 в биологических жидкостях методом ВЭЖХ для изучения доклинической фармакокинетики / Д.А. Козин, З.С. Шпрах, А.П. Будько, В.Ю. Решетняк // Гармонизация подходов к фармацевтической разработке: сборник тезисов III Международной научно-практической конференции, Москва, 25 ноября 2020 года Российский университет дружбы народов. – Москва: Российский университет дружбы народов (РУДН), 2020. – С. 195–198.

22. Основные методы повышения растворимости гидрофобных и труднорастворимых веществ. / И.Д. Гулякин, Л.Л. Николаева, Н.А. Оборотова [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. – Т.2. – №15. – С. 52–59.

23. Отто, М. Современные методы аналитической химии / М. Отто – Москва : Техносфера, 2021.– 656 с.

24. Патент № 2 548 045 С1 (RU) N-гликозиды индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов, обладающие противоопухолевой активностью МПК С07Н 19/04, А61К 31/7008, А61Р 35/00 / Л.М. Борисова, И.С. Голубева, О.В. Горюнова [и др.]; заявитель и патентообладатель ФГБУ "РОНЦ им. Н.Н. Блохина" РАМН - 2014107507/04; заявл. 2014.02.27; опубл. 2015.04.10

25. Патент № 2 667 906 С1 (RU) МПК С07Н19/23 Производное класса N-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дионон - N-{12-(β-D-ксилопиранозил)-5,7-диоксо-индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-6-ил} пиридин-2-карбоксамид, обладающее цитотоксической и противоопухолевой активностью / И.С. Голубева, В.А. Еремина, Н.И. Моисеева [и др.]; заявитель и патентообладатель ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина" Минздрава России - 2017131729; заявл. 2017.09.11; опубл. 2018.09.25

26. Патент № 2427585 С9 (RU) МПК С07Н19/23. Способ получения N-гликозидов производных индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дионон, обладающих цитотоксической и противоопухолевой активностью / С.Я.Мельник, Н.К. Власенкова, Л.Д. Гараева [и др.]; заявитель и патентообладатель заявитель и патентообладатель ФГБУ "РОНЦ им. Н.Н. Блохина" РАМН -2009145651/04; заявл. 2009.12.10; опубл. 2011.08.27

27. Поиск ингибиторов топоизомераз I и/или II среди N-гликозидов производных индоло-[2,3-а]карбазолов для лечения злокачественных опухолей / З.С. Смирнова, Л.М. Борисова, М.П. Киселева,Т.Д. [и др.] // Материалы симпозиума «Результаты фундаментальных и прикладных исследований для создания новых лекарственных средств» (Москва, 9–11 июня 2008 г.), 191–192.

28. Поиск новых противоопухолевых соединений среди производных N-гликозидов индоло[2,3-а]карбазолов. / М.П. Киселева, З.С. Смирнова, Л.М. Борисова [и др.] // Российский онкологический журнал. – 2015. – Т.20. – №1. – С. 33–37.

29. Практическая газовая и жидкостная хроматография : Учебное пособие для студентов химических, биологических, экологических и медицинских специальностей вузов / Б. В. Столяров, И. М. Савинов, А. Г. Витенберг [и др.]; Санкт-Петербургский государственный университет - Санкт-Петербург : Издательство Санкт-Петербургского государственного университета, 1998. - 610 с.

30. Производные индоло[2,3-а]карбазола, обладающие противоопухолевой активностью, и инструментальные методы их стандартизации (обзор) / Д.А. Козин, З.С. Шпрах, В.Ю. Решетняк [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2020. – Т. 9. – № 4. – С. 128–135. DOI 10.33380/2305-2066-2020-9-4-128-135.

31. Противоопухолевая активность некоторых производных N-гликозидов индоло[2,3-а]карбазолов с углеводным остатком ксилозой / И.С. Голубева, Н.П. Яворская, Л.В. Эктова [и др.] // Российский биотерапевтический журнал – 2020. – Т.19. – №4. – С. 86–93.

32. Разработка новой технологии получения лекарственной формы для внутривенного введения производного индолокарбазола ЛХС-1208 / И.Д. Гулякин, А. Хашем, Л.Л. Николаева [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2016. –Т.15. – №2. – С. 55–60.

33. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности: методические рекомендации / под ред. Н.В. Юргеля, А.Л. Младенцева, А.В. Бурдейна [и др.] – Москва : Спорт и Культура – 2007. – 192 с.

34. Руководство по экспертизе лекарственных средств: Т. 2. – Москва : Гриф и К – 2013. – 280 с.

35. Синтез и антипролиферативные свойства гликозидов бис(индолил)фуран-2,5-диона и бис(индолил)-1Н-пиррол-2,5-диона / С.Я. Мельник, А.А. Бахмедова, Л.Д. Гараева [и др.] // Биоорганическая химия. – 1996. – Т.22. – №6. – С.458–467.

36. Смирнова, З.С. Противоопухолевая активность N-гликозидов производных индоло[2,3-а]карбазола / З.С. Смирнова, И.Ю. Кубасова, Л.М. Борисова // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т.5. – №3. – С.123–127.

37. Смит А. Прикладная ИК-спектроскопия / А. Смит; – Москва : Мир, 1982. – 328 с.

38. Снайдер, Л.Р. Введение в современную жидкостную хроматографию / Л.Р. Снайдер, Дж.Дж. Киркленд, Д.У. Долан Москва: Техносфера, 2020. – 960 с.+17 с. цв. вкл.

39. Стандартизация ЛХС-1208 / И.В. Ярцева, Е.В. Игнатьева, Н.А. Дмитричева [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2016. – Т.15 – №.1. – С.126–127.

40. Стандартизация субстанции ЛХС-1269, обладающей противоопухолевой активностью / Д.А. Козин, З.С. Шпрах, В.Ю. Решетняк // Сборник материалов X Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». — СПХФУ Санкт-Петербург, 2020.

41. Стандартизация фармацевтической субстанции препарата ЛХС-1208 / Е.В. Игнатьева, И.В. Ярцева, З.С. Шпрах [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2021. – Т.10. – №3. – С. 88–94. DOI 10.33380/2305-2066-2021-10-3-88-94.

42. Суворов, Н. Н. Синтез N-(b-D-тетраацетилглюкопиранозил) индола / Н. Н. Суворов, М. Н. Преображенская // Журнал Органической Химии. – 1960. – Т.30. – №7. – С.2434–2435.

43. Тарасевич, Б.Н. ИК-спектры основных классов органических соединений: Справочные материалы / Б.Н. Тарасевич. – Москва : издательство МГУ, 2012. – 54 с.

44. Татарский, В.В. Механизмы гибели опухолевых клеток при действии новых углеводных производных индолокарбазолов : специальность 14.01.12 «Онкология» автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Татарский Виктор Вячеславович ; РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН. – Москва, 2010. – 108 с.

45. Татарский, В.В. Механизмы противоопухолевого действия нового производного индолокарбазолов / В.В. Татарский, И.Л. Плихтяк, С.Я. Мельник [и др.] // Материалы конференции «Фундаментальная онкология. 2-е Чтения им. проф. Н.Н. Петрова». Санкт-Петербург, 2006. Вопросы онкологии. – 2006. – Т. 52. – С. 38–39.

46. Устынюк, Ю. А. Лекции по спектроскопии ядерного магнитного резонанса. Часть 1 (вводный курс) / Ю.А. Устынюк – М.: Техносфера, 2016.– 288 с.

47. Хашем, Али. Создание и биофармацевтические исследования липосомальной лекарственной формы производного индолокарбазола : специальность 14.04.01 «Технология получения лекарств» автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук: / Хашем Али ; ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет). - М., 2019.- 139 с.

48. Шаназаров, К. С. Правила составления, изложения и оформления стандартов качества на фармацевтические субстанции : Методические рекомендации / К. С. Шаназаров – Москва : Дом печати "Столичный бизнес", 2009. – 68 с.

49. Шатц, В.Д. Высокоэффективная жидкостная хроматография : Основы теории. Методология. Применение в лекарств. химии / В. Д. Шатц, О. В. Сахартова; АН ЛатвССР, Ин-т орган. синтеза. - Рига : Зинатне, 1988. - 390 с.

50. Экман, Р. Масс-спектрометрия: аппаратура, толкование и приложения / Р. Экман, Е. Зильберинг, Э. Вестсан-Бринкмальм, А. Край – Москва: Техносфера, 2013; 368 С. + 16 С. цв. вкл.

51. Экспериментальная онкология на рубеже веков. / Под ред. М.И. Давыдова, А.Ю. Барышникова. – Москва : РОНЦ, 2003. – С. 281-293.

52. Экспериментальная онкология на рубеже веков. / Под ред. М.И. Давыдова, А.Ю. Барышникова. – Москва : РОНЦ, 2003. – С. 5-51

53. Эпштейн, Н. А. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе (обзор) / Н. А. Эпштейн, // Химико-фармацевтический журнал – 2004. – Т.38. – №4. – С.40–56.

54. Эпштейн, Н.А. Определение внутрилабораторной прецизионности (воспроизводимости) при валидации методик в фармации / Н.А. Эпштейн, // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. – Т.1 – №14. – С.106–117.

55. Эрмер, Й. Валидация методик в фармацевтическом анализе: Примеры наилучшей практики / Й. Эрмер, Дж. Х.Мак, Б. Миллер. – Москва : Группа компаний ВИАЛЕК, 2013. – 512 С.

56. 39-N-carboxamido-staurosporine and selina-4(14),7(11)-diene-8,9-diol, new metabolites from a marine *Streptomyces* sp. / S.J. Wu, S. Fotso, F. Li, [et al.] // J. Antibiot. – 2006. – Vol.59. – №6. – P.331–337.

57. 3'-demethoxy-3'-hydroxystaurosporine a Novel Staurosporine Analogue Produced by a Blocked Mutant / P. Hoehn, O. Ghisalba, T. Moerker, H.H. Peter // The Journal of Antibiotics. – 1995. – Vol.48. – №4. – P.300–305. DOI: 10.7164/antibiotics.48.300

58. 4'-N-methyl-5'-hydroxystaurosporine and 5'-hydroxystaurosporine, new indolocarbazole alkaloids from a marine *Micromonospora* sp. Strain / L.M. Hernández, J.A. Blanco, J.P. Baz [et al.] // The Journal of. Antibiotics. – 2000. – Vol.53. – №9. – P.895–902. DOI: 10.7164/antibiotics.53.895

59. A high-performance liquid chromatography method using ultraviolet and fluorescence detection for the quantitation of UCN-01, 7-hydroxystaurosporine, from human plasma and saliva / K.S. Bauer, R.M. Lush, M.A. Rudek [et al.] // *Biomedical Chromatography*. – 2000. – Vol.14. – №5. – P.338–343. DOI: 10.1002/1099-0801(200008)14:5<338::AID-BMC993>3.0.CO;2-6

60. A new alkaloid AM-2282 of *Streptomyces origin*. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization / S. Omura, Y. Iwai, A. Hirano [et al.] // *The Journal of Antibiotics*. – 1977. – Vol.30. – №4. – P.275-282. DOI: 10.7164/antibiotics.30.275

61. A new indolocarbazole derivative in melanoma and carcinoma lung in vivo treatment. *BMC* / A. Lantsova, I. Golubeva, L. Borisova [et al.] // *BMC Complementary Medicine and Therapies*. — 2021. — Vol. 21, № 1. — P. 1–6. DOI: 10.1186/s12906-021-03294-2

62. Alkaloids as anticancer agents: a review of chinese patents in recent 5 years / H. Tao, L. Zuo, X. Huanli [et al.] // *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*. – 2020. – Vol.15. – №1. – P.2–13

63. An Improved Method for the Synthesis of the of Indole[2,3-a]Pyrrolo[3,4-c]Carbazole-5,6-Dione N-Glycosides and their Cytotoxic Activity / L.V. Ektova, O.V. Goryunova, V.A. Eremina [et al.] // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2019. – Vol.53 – №4. – P.604–609. DOI: 10.1007/s11094-019-02046-44

64. An indolocarbazole inhibitor of human checkpoint kinase (Chk1) abrogates cell cycle arrest caused by DNA damage / J.R. Jackson, A. Gilmartin, C. Imburgia [et al.] // *Cancer Research* – 2000. – Vol.60. – №3. – P.566–572.

65. Analytical procedure for the determination of the new antitumour drug N-benzoylstauroporine and three potential metabolites in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography / R. Van Gijn, O. Van Tellingen, J.J.M. de Clippeleir [et al.] // *Journal of chromatography B, Biomedical Science and Applications*. –1995. – Vol.667. – №2. – P.269–276. DOI: 10.1016/0378-4347(95)00037-j.

66. Antiamoebic Activities of Indolocarbazole Metabolites Isolated from *Streptomyces sanyensis* Cultures / L. Cartuche, M. Reyes-Batlle, I. Sifaoui [et al.] // *Marine Drugs*. – 2019. – Vol.17. – №10. – P.588–603 DOI:10.3390/md17100588

67. Antikinetoplastid Activity of Indolocarbazoles from *Streptomyces sanyensis* / L. Cartuche, I. Sifaoui, A. Lopez-Arencibia [et al.] // *Biomolecules*. – 2020. – Vol.10 – №4. – P.657-671 DOI: 10.3390/biom10040657

68. Antiproliferative activity of a new derivative from the class of N-glycoside of indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazoles / M.P. Kiseleva, L.M. Borisova, G.B. Smirnova, [et al.] // *Research Results in Pharmacology* – 2022. – Vol.8. – №2. – P.49–57. DOI:10.3897/rrpharmacology.8.79424

69. AT2433-A1, AT2433-A2, AT2433-B1 and AT2433-B2 novel antitumor compounds produced by *Actinomadura mellioura*. Structure determination / J. Golik, T.W. Doyle, B. Krishnan [et al.] // *J. Antibiotics*. – 1989. – Vol.42. – №12. – P.1784–1789.

70. AT2433-A1, AT2433-A2, AT2433-B1, and AT2433-B2 novel antitumor antibiotic compounds produced by *Actinomadura mellioura*. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties / J.A. Matson, C. Claridge, J.A. Bush, [et al.] // *The Journal of Antibiotics*. – 1989. – Vol.42. – №11. – P.1547-1555. DOI: 10.7164/antibiotics.42.1547

71. *British Pharmacopeia 2023* / H.M. Stationary Office. – London: H.M. Stationary Office. – 2023.

72. Bush, J.A. Production and biological activity of rebeccamycin, novel antitumor agent / J.A. Bush, B.H. Long, J.J. Catino, W.T. Brander // *The journal of antibiotics*. – 1987. – Vol.40. – №5. – P.668–678.

73. Carbazole scaffolds in cancer therapy: a review from 2012 to 2018 / S. Issa, A. Prandina, N. Bedel [et al.] // *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. – 2019. – Vol.34. – №1. – P.1321–1346. DOI:10.1080/14756366.2019.1640692

74. Characterization of the Biosynthetic Gene Cluster of Rebeccamycin from *Lechevalieria aerocolonigenes* ATCC 39243 / H. Onaka, S. Taniguci, Y. Igarashi,

T. Furumai // *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. – 2003. – Vol.67. – №1. – P.127-138. DOI: 10.1271/bbb.67.127

75. Chemistry and Properties of Indolocarbazoles. / T. Janosik, A. Rannug, U. Rannug [et al.] // *Chemical Reviews*. – 2018. – Vol.118 – №18. – P.9058–9128 DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00186

76. Chen, S. Anti-tumor activity of indolecarbazole compounds and their derivatives / S. Chen, Q. You // *Progress in chemistry*. – 2008. – Vol.20. – №2/3. – P.367–374.

77. Cytotoxic indolocarbazoles alkaloids from the streptomyces sp. A65 / B. Zhou, L. Qin, W. Ding, Z. Ma // *Tetrahedron*. –2017. – Vol.74. – №7. – P.726–730. DOI: 10.1016/j.tet.2017.12.048

78. Cytotoxic, antiviral indolocarbazoles from a blue-green alga belonging to the Nostocaceae / G. Knübel, L. K. Larsen, R.E. Moore [et al.] // *The Journal of Antibiotics*. – 1990. – Vol.43. – №10. – P.1236–1239. DOI: 10.7164/antibiotics.43.1236

79. Development of a simplified, sensitive high-performance liquid chromatographic method using fluorescence detection to determine the concentration of UCN-01 in human plasma / J.A. Smith, J. Cortes, R.A. Newman, T.L. Madden // *Journal of Chromatography. B, Biomedical Science and Applications*. – 2001. – Vol.760. – №2. – P.247–253. DOI: 10.1016/S0378-4347(01)00276-629)

80. Discovery, biosynthesis, and heterologous production of loonamycin, a potent anticancer indolocarbazole alkaloid / C.L. Yang, B. Zhang, W. Xue [et al.] // *Organic Letters*. – 2020. – Vol.22. – №12. – P.4665–4669 DOI: 10.1021/acs.orglett.0c01456

81. Disney, A.J.M. Alkylation of Staurosporine to Derive a Kinase Probe for Fluorescence Applications / A.J.M. Disney, B. Kellam, L.V. Dekker // *ChemMedChem*. – 2016. – Vol.11. – №9. P.972-979. DOI: 10.1002/cmdc.201500589

82. European Pharmacopoeia, 10th Edition. / European Department for the Quality of Medicines. Strasbourg, France. – 2019.

83. Faul, M. M. A general approach to the synthesis of bisindolylmaleimides: synthesis of staurosporine aglycone / M. M. Faul, K. A. Sullivan, L. L. Winneroski // *Synthesis*. – 1995. – V. 1995. – №. 12. – P.1511–1514

84. Further Minor Metabolites of Staurosporine Produced by a *Streptomyces longisporoflavus* Strain / Y. Cai, A. Fredenhagen, P. Hug, T. Meyer [et al.] // *The Journal of Antibiotics*. – 1996. – Vol.49. – №6. – P.519–526. DOI: 10.7164/antibiotics.49.519

85. Fusetani, N. *Marine Natural Products. Natural products in chemical biology* / N. Fusetani // New York: John Wiley & Sons, Inc. – 2012. – P.31.

86. High-performance liquid chromatographic analysis of the new four potential metabolites in micro-volumes of plasma / R. Van Gijn, E. Havik, E. Boven [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 1995. – Vol.14. – №1–2. – P.165–174. DOI: 10.1016/0731-7085(95)01616-3

87. Identification, Structure–Activity Relationships of Marine-Derived Indolocarbazoles, and a Dual PKC θ/δ Inhibitor with Potent Antipancreatic Cancer Efficacy. / J. Wang, W. Jin, X. Zhou [et al.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2020. – Vol.63. – №21. – P.12978–12991 DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c01271

88. Indolo[2,3-a]carbazoles: diversity, biological properties, application in antitumor therapy / R. G. Zenkov, L. V. Ektova, O. A. Vlasova [et al.] // *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. – 2020. – Vol.56. – №6. – P.644–658 DOI:10.1007/s10593-020-02714-4

89. M. Inhibition of the cellular actions of nerve growth factor by staurosporine and K252A results from the attenuation of the trk tyrosine kinase / M. Ohmichi, S.J. Decker, L. Pang, A. Saltiel // *Biochemistry*. – 1992. – Vol.31. – №16. – P.4034–4039.

90. Molecular Mechanisms of Anticancer Activity of N-Glycosides of Indolocarbazoles LCS-1208 and LCS-1269 / R.G. Zenkov, O.A. Vlasova, V.P. Maksimova [et al.] // *Molecules*. – 2021. – Vol.26. – №23. – P.7329. DOI:10.3390/molecules26237329

91. N6-дипептидные производные N12-рибозил-индоло[2,3-*a*]карбазола / О.В. Горюнова, Г.М. Захарчук, О.С. Жукова, Л.В. Фетисова, Н.Е. Кузьмина // Биоорганическая химия. – 2014. – Т.40. – №1. – С. 12–19. DOI 10.7868/S0132342314010047
92. Nakanishi, S. K-252a, a novel microbial product, inhibits smooth muscle myosin light chain kinase / S. Nakanishi, K. Yamada, H. Kase // J. Biol. Chem. – 1988. – Vol.13. – №5. – P.6215–6219.
93. Nettleton, D.E. Isolation and structure of rebeccamycin – a new antitumor antibiotic from *Nocardia aerocoligenes* / D.E. Nettleton, T.W. Doyle, B. Krishnan // Tetrahedron Letters – 1985. – Vol.26 – №34. – P.4011-4014. DOI: 10.1016/S0040-4039(00)89280-1
94. Novel antitumor indolocarbazole compound 6-N-formylamino-12,13-dihydro-1,11-dihydroxy-13-(beta-D-glucopyranosyl)-5H-indolo[2,3-*a*]pyrrolo[3,4-*c*]carbazole-5,7(6H)-dione (NB-506): induction of topoisomerase I-mediated DNA cleavage and mechanisms of cell line-selective cytotoxicity./ T. Yoshinari, M. Matsumoto, H. Arakawa [et al.] // Cancer Res. – 1995. – Vol.55 – №6 – P.1310 – 1315.
95. Novel antitumor L-arabinose derivative of indolocarbazole with high affinity to DNA / D.N. Kaluzhny, V.V. Tatarskiy, L.G. Dezhenkova [et al.] // ChemMedChem. – 2009. – Vol.4 – №10. – P.1641–1648.
96. Novel Indolocarbazole Compound 6-N-Formylamino-12,13- dihydro-1,11-dihydroxy-13-(β-d-glucopyranosyl)-5H-indolo[2,3-*a*]pyrro[3,4-*c*] carbazole-5,7(6H)-dione: Its Potent Antitumor Activities in Mice / H. Arakawa, T. Iguchi, M. Morita, T. Yoshinari [et al.] // Cancer Research –1995. – Vol.55. – №.6. – P.1316–1320.
97. N-гликозиды производных индоло[2,3-*a*]карбазола / А.А. Бахмедова, Л.Д. Гараева, О. В. Горюнова [и др.] // Биоорганическая химия. – 1997. – Т.23. – №8. – С. 667–674.

98. One new indolocarbazole alkaloid from the *Streptomyces* sp. A22 / X. Cheng, B. Zhou, H. Liu, C. Huo, W. Ding // *Natural Product Research*. – 2018. – Vol.32 – №21. – P.2583-2588 DOI: 10.1080/14786419.2018.1428595

99. Patent № 4,567,143 [US] Int. Cl. C12P 17/18; C12R 1/365. Process for preparing 4'-deschlororebeccamycin / J.A. Matson; assignee Bristol Myers Co. - № 690,271; Filed: Mar. 18, 1985; Pub.: Jan. 28, 1986

100. Patent № 5,158,938 (US) Int. Cl. C07D 273/00; A61K 31/00. Rebeccamycin / S. Forenza, K.S. Lam, J.A. Matson, J. Mattei, D.R. Schroeder; assignee Squibb Bristol Myers Co. - 764,116; Filed: Sep. 23, 1991; Pub.: Oct. 27, 1992

101. Patent № 5,326,754 (US) Int. Cl. 536/27.1; 514/42, 43; 5/85, 87. Antitumor antibiotic BMY-41219 / S. Forenza, S. Lan Kin, J.A. Matson, J. Mattei, L. McDonald; assignee Squibb Bristol Myers Squibb Co. – 63,383; Filed: May 18, 1993; Pub.: Jul. 5, 1994

102. Patent № CN1035878C (CN) Int. Cl. C07H 19/13 Co7H 19/044 A61K 31/20 Indolopyrrolocarbazole derivatives / K. Kojiri, H. Kondo, H. Aracawa, M. Ohkubo, H. Suda ;assignee Banyu Pharmaceutical Co., Ltd.,– 93100326.1; Filed: Jan. 2, 1993; Pub.: Jun. 14, 1997

103. Patent №6703373B1 (US) Int. Cl. A01N 43/04; A61K 31/70; C07H 15/00; CO7H 19/00; CO7H 19/22. Indolopyrrolocarbazole derivatives and antitumor agents / K. Kojiri, H. Kondo, H. Aracawa M. Ohkubo, H. Suda; assignee Banyu Pharmaceutical Co., Ltd.,– 10/070,825; Filed: Mar. 11, 2002; Pub.: Mar. 9, 2004

104. Pereira Rodrigues, E. Structure – activity relationships in a series of substituted indolocarbazoles: topoisomerase I and protein kinase C inhibition and antitumoral and antimicrobial properties / E. Pereira Rodrigues, L. Belin, M. Sancelme [et al.] // *J. Med.Chem.* – 1996. – Vol.39. – P.4471–4477.

105. Phase-II trial of rebeccamycin analog, a dual topoisomerase-I and -II inhibitor, in relapsed "sensitive" small cell lung cancer / A. Schwandt, T. Mekhail, B. Halmos [et al.] // *J. Thorac. Oncol.* – 2012. – Vol.7. –№4. – P.751–754.

106. Pindur, U. Advances in indolo [2,3-a]carbazole chemistry: design synthesis of protein kinase C and topoisomerase I inhibitors / U. Pindur, Y.S. Kim, F. Mehrabani // *Curr. Med. Chem.* – 1999. – Vol.6. – №1. – P.29–69.

107. Precursor-Directed Generation of Indolocarbazoles with Topoisomerase II α Inhibitory Activity / C. Wang, A. Monger, L. Wang, P. Fu // *Marine Drugs* – 2018. – Vol.16. – №5. – P.168-177. DOI:10.3390/md16050168

108. Production, isolation and structure determination of novel fluorindolocarbazoles from *Saccharothrix aerocolonigenes* ATCC 39243 / K.S. Lam, D.R. Schroeder, J.M. Veitch [et al.] // *The Journal of Antibiotics.* – 2001. – Vol.54. – №1. – P.1-9. DOI: 10.7164/antibiotics.54.1

109. Salas, J.A. Indolocarbazole anti-tumour compounds by combinatorial biosynthesis / J.A. Salas, C. Méndez // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2009. – Vol.13. – №2. – P.152–160.

110. Shprakh, Z. Development and Validation of HPLC Method for Analysis of Indolocarbazole Derivative LCS-1269 / Z. Shprakh, A. Budko, D. Kozin [et al.] // *Farmatsija.* – 2021. – Vol.68. – №2. – P.427–431. DOI 10.3897/PHARMACIA.68.E63457.

111. *Streptomyces scabiei* subsp. *xuchangensis*, a novel streptomycete isolate for staurosporine production and a wheat tale-all control agent / C. Wen, D. Zheng, S.-H. Shen [et al.] // *International Journal of Microbiology Research.* – 2012. – Vol.4. – №7. – P.282–289. DOI: 10.9735/0975-5276.4.7.282-289

112. Stuart, B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications* / Stuart B. John Wiley & Sons, Chichester, 2004. – 242 p.

113. Study on the Synthesis and Antitumor Activity of New Indolocarbazole Compounds / L. L. Zhao, F. Zhai, M. Xie, G. Qi // *Chinese Journal of Structural Chemistry.* – 2016. – Vol.35. – №2. – P.205–211. DOI:10.14102/j.cnki.0254-5861.2011-0967

114. Synthesis and Antitumor Activity of Staurosporine Derivatives / G. Li, D. Wu, Y. Xu [et al.] // *Natural Product Communications*. – 2022. – Vol.17. – №6. P. 1–6

115. Synthesis and biological profile of the pan-vascular endothelial growth factor receptor/tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor-like homology domains 2 (VEGF-R/TIE-2) inhibitor 11-(2-methylpropyl)-12,13-dihydro-2-methyl-8-(pyrimidin-2-ylamino)-4H-indazolo [5,4-a]pyrrolo[3,4-c]carbazol-4-one (CEP-11981): a novel oncology therapeutic agent / R.L. Hudkins, N.C. Becknell, A.L. Zulli [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2012. – Vol.55. – №2. – P.903–913.

116. Synthesis and Cytotoxic Activity of Indolo[2,3-a]Pyrrolo[3,4-c]Carbazole-5,7-Dione N-Glycosides Substituted on the Maleimide Nitrogen Atom / L.V. Ektova, V.A. Eremina, N.I. Tikhonova [et al.] // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2020. – Vol.54. – №5. – P.455–458. DOI:10.1007/s11094-020-02222-x

117. TAN-999 and TAN-1030A, new indolecarbazole alkaloids with macrophage-activating properties / S. Tanida, M. Takizawa, S. Takahashi [et al.] // *The Journal of Antibiotics*. – 1995. – Vol.42. – №11. – P.1619–1630. DOI: 10.7164/antibiotics.42.1619

118. The biosynthetic origins of rebeccamycin / C.J. Pearce, T.W. Doyle, S. Forenza [et al.] // *Journal of Natural Products*. – 1988. – Vol.51. – №5. – P.937–940. DOI: 10.1021/np50059a020

119. The United States Pharmacopeia 43. The National Formulary 38. – Vol. 1,5. – 2020.

120. Thompson J.M. *Infrared Spectroscopy*. Pan Stanford Publishing. – 2018. –196 P.

121. Townsend, L.B. *Chemistry of Nucleosides and Nucleotides* / L.B.Townsend – New York ; London : Plenum Press, 1993. – Vol. 3. – P. 1–105.

122. Two indolocarbazole alkaloids with apoptosis activity from a marinederived actinomycete Z2039-2 / R. Liu, T. Zhu, D. Li J. Gu [et al.] // *Arch. Pharm. Res.* – 2007. – Vol.30. – №3. – P.270–274.

123. Water soluble derivatives of rebeccamycin / T. Kaneko, H. Wong, J. Utzig
J. Schurig, T.W. Doyle // The Journal of Antibiotics. – 1990. – Vol.43 – №1. – P.125–
127. DOI: <https://doi.org/10.7164/antibiotics.43.125>

Приложение А. Акт о внедрении результатов научно-исследовательской работы в учебный процесс



07 НОН 2022

АКТ 000160

о внедрении результатов диссертации Козина Дмитрия Андреевича в учебный процесс кафедры химии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации Козина Дмитрия Андреевича на тему «Разработка методов анализа и стандартизации производных индоло[2,3-а]карбазола, обладающих противоопухолевым действием» внедрены в учебный процесс кафедры химии Института фармации им. А.П. Нелюбина при изучении дисциплины Методы фармакопейного анализа, читаемой студентам по направлению подготовки (специальности) 33.05.01 Фармация

Директор Института
фармации им. А.П. Нелюбина
д.фарм наук, профессор

(подпись)

Г.В. Раменская

Заведующая кафедрой химии,
д.фарм наук, профессор

(подпись)

О.В.Нестерова

Начальник Учебного управления

(подпись)

Л.Ю.Юдина

**Приложение Б. Акт о внедрении результатов научной и инновационной
деятельности**

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России)**

115478 Москва, Каширское шоссе, д. 24;
Тел. +7 (499) 324-24-24; e-mail: info@ronc.ru; http://www.ronc.ru
ОГРН 1037739447525, ИНН/КПП 7724075162/772401001, ОКПО 01897624

**Federal State Budgetary Institution
«N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology»
of the Ministry of Health of the Russian Federation
(N.N. Blokhin NMRCO)**

115478 Kashirskoe shosse, 24, Moscow, Russia
Phone: +7 (499) 324-24-24; e-mail: info@ronc.ru; http://www.ronc.ru

№ 5Н
« 9 » ноября 2022 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертации Козина Дмитрия Андреевича
в работу НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Настоящий акт подтверждает, что основные научные
положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации
Козина Дмитрия Андреевича
на тему «Разработка методов анализа и стандартизации
производных индоло[2,3-а]карбазола, обладающих противоопухолевым действием»
внедрены в работу НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава
России и применяются при контроле качества фармацевтических субстанций ЛХС-1208 и
ЛХС-1269.

Директор
НИИ ЭДиТО
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России к.б.н.



В.С. Косоруков

(подпись)

В.С. Косоруков

**Приложение В. Проект спецификации на фармацевтическую субстанцию
ЛХС-1208**

ПОКАЗАТЕЛИ	МЕТОДЫ	НОРМЫ
Описание	Визуальный	Аморфный порошок оранжевого цвета, без запаха
Растворимость	ГФ XIV	Растворим в ДМСО; умеренно растворим в ДМФА; очень мало растворим в спирте этиловом 96 %, практически нерастворим в воде
Подлинность	Спектрофотометрия	УФ-спектр 0,0006 % раствора ЛХС-1208 в ДМФА в области от 200 до 500 нм должен иметь максимумы поглощения при 287±2 нм, 320±2 нм, слабо интенсивный максимум при 400±2 нм; плечо при 306±2 нм и 343±2 нм и минимумы при 271±2 нм, 293±2 нм и 381±2 нм.
	ИК-спектрометрия	ИК-спектр ЛХС-1208 в области от 4000 до 400 см ⁻¹ должен иметь полное совпадение полос поглощения с рисунком ИК-спектра из НД
	ВЭЖХ	Время удерживания пика ЛХС-1208 должно быть 12,00-12,20 мин.
Удельный показатель поглощения	ГФ XIV	От 1024 до 1084 в пересчете на сухое вещество (ДМФА, 320±2 нм)
Удельное вращение	ГФ XIV	От +58 до +61 °
Прозрачность раствора	ГФ XIV	Раствор 0,006 г ЛХС-1208 в 100 мл ДМФА должен быть прозрачным
Посторонние примеси	ВЭЖХ	Любая единичная неидентифицированная примесь – не более 1,00 %; сумма примесей – не более 3,00 %
Сульфатная зола и тяжелые металлы	ГФ XIV	Сульфатная зола – не более 0,1 %; тяжелые металлы – не более 0,001 %
Вода (по методу К.Фишера)	ГФ XIV	Не более 1,00 %
Количественное определение	ВЭЖХ	Не менее 97,00 %
Микробиологическая чистота	ГФ XIV	Категория 1.2 Б

Упаковка	По 100 или 200 г в банках оранжевого стекла с навинчиваемыми пластмассовыми крышками и прокладками из полиэтилена. На банки наклеивают этикетки. Банки обертывают бумагой мешочной, обвязывают нитками, наклеивают такую же этикетку, после чего помещают в пакеты полиэтиленовые и запаивают.
Маркировка	В соответствии с НД
Назначение	Для приготовления инъекционных лекарственных форм

Директор НИИ ЭДиТО
ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,
кандидат биологических наук

 В.С. Косоруков

В.С. Косоруков

**Приложение Г. Проект спецификации на фармацевтическую субстанцию
ЛХС-1269**

ПОКАЗАТЕЛИ	МЕТОДЫ	НОРМЫ
Описание	Визуальный	Аморфный порошок желтого цвета, без запаха
Растворимость	ГФ XIV	Растворим в ДМФА; умеренно растворим в ДМСО; очень мало растворим в спирте этиловом 96 %, практически нерастворим в воде
Подлинность	Спектрофотометрия	УФ-спектр 0,0004 % раствора ЛХС-1269 в ДМФА в области от 200 нм до 500 нм должен иметь максимумы поглощения при длинах волн 286±2 нм и 319±2 нм, слабоинтенсивный максимум при 413±2 нм; плечо при 308±2 нм; плечо при 337±2 нм и минимумы при 278±2 нм, 295±2 нм и 375±2 нм.
	ИК-спектрометрия	ИК-спектр в области от 4000 см ⁻¹ до 400 см ⁻¹ должен полностью совпадать с рисунком ИК-спектра, приведенным в проекте НД
	ВЭЖХ	Время удерживания пика ЛХС-1269 должно быть 3,9- 4,0 мин.
Удельный показатель поглощения	ГФ XIV	От 1040 до 1100 в пересчете на сухое вещество (ДМФА, 320±2 нм)
Удельное вращение	ГФ XIV	От +58 до +60 °
Прозрачность раствора	ГФ XIV	Раствор 0,004 г ЛХС-1269 в 100 мл ДМФА должен быть прозрачным
Родственные примеси	ВЭЖХ	Общая сумма примесей – не более 3,0 % ЛХС-1269-Х – не более 0,9% ЛХС-1269-У – не более 1,5 % Любая единичная неидентифицированная примесь – не более 1,0 %
Сульфатная зола и тяжелые металлы	ГФ XIV	Сульфатная зола - не более 0,10 %; тяжелые металлы - не более 0,001 %
Вода (по методу К.Фишера)	ГФ XIV	Не более 2,5 %
Количественное определение	ВЭЖХ	Не менее 97,00 %
Микробиологическая чистота	ГФ XIV	Категория 1.2 Б

Упаковка	По 100 или 200 г в банках оранжевого стекла с навинчиваемыми пластмассовыми крышками и прокладками из полиэтилена. На банки наклеивают этикетки. Банки обертывают бумагой мешочной, обвязывают нитками, наклеивают такую же этикетку, после чего помещают в пакеты полиэтиленовые и запаивают.
Маркировка	В соответствии с НД
Назначение	Для приготовления инъекционных лекарственных форм

Директор НИИ ЭДиТО
 ФГБУ «НМИЦ онкологии
 им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,
 кандидат биологических наук



В.С. Косоруков

В.С. Косоруков