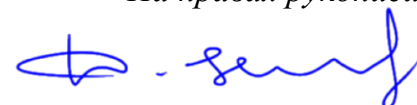


*На правах рукописи*



**Луценко Дарья Николаевна**

**Обоснование норм качества нового биологически активного соединения  
кардиопротекторного действия**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

Москва – 2025

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

доктор фармацевтических наук,  
профессор

**Компанцева Евгения Владимировна**

**Официальные оппоненты:**

**Зилфикаров Ифрат Назимович** – доктор фармацевтических наук, профессор РАН, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», отдел химии природных соединений, главный научный сотрудник

**Писарев Дмитрий Иванович** – доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный университет им. А.Н. Косыгина (Технологии. Дизайн. Искусство)», кафедра органической химии, заведующий кафедрой

**Ведущая организация:**

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «21» мая 2025 г. в 12.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.002.02 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37/1 и на сайте <https://www.sechenov.ru>.

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета ДСУ 208.002.02  
доктор фармацевтических наук, профессор

Демина Наталья Борисовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Патологии сердечно-сосудистой системы (ССС) являются одной из главных причин смертности населения. Защита миокарда различными фармакологическими средствами – неотъемлемая составляющая лечения заболеваний ССС.

Одной из таких групп, повышающей адаптацию сердечной мышцы к ишемии и реперфузии, является группа ингибиторов  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обменника изоформы NHE-1.

Изучив данные литературных источников о доклинических и клинических испытаниях, можно сделать вывод, что NHE-1 – важная фармакологическая мишень. Для снижения последствий ишемического и реперфузионного стресса группа препаратов ингибиторов  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обменника является перспективной и гарантирует внедрение нового класса кардиопротекторов в медицинскую практику.

С этой целью на кафедре фармацевтической и токсикологической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации было синтезировано биологически активное соединение (БАС) – производное хиназолина: *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидин (VMA-13-15).

Проведение доклинических испытаний показало возможность его использования в качестве кардиопротекторного и нейропротекторного средства, превышающего по своей эффективности зарубежный препарат Зонипорид.

Контроль качества и разработка современных, объективных методик фармацевтического анализа лекарственных средств является одним из базовых этапов его внедрения в производство. Однако для этого необходимо всестороннее исследование физико-химических характеристик лекарственного средства, которые могут влиять на фармакокинетические и фармакодинамические свойства, а также позволят осуществить обоснование его норм качества.

### Степень разработанности темы исследования

*N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидин (VMA-13-15) – новое

соединение, производное хиназолина, фармацевтический анализ и стандартизация по основным физическим, химическим и физико-химическим показателям до настоящего времени не проводилась.

### Цель и задачи исследования

Целью данной работы является обоснование показателей контроля качества нового биологически активного соединения, обладающего кардиопротективной активностью, *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина (VMA-13-15), для создания проекта фармакопейной статьи.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Изучить физико-химические характеристики *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина для установления показателей контроля качества с использованием современных методов фармацевтического анализа.

2. Изучить химические свойства и характер УФ- и ИК-спектров *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина с целью разработки методик установления подлинности.

3. Теоретически обосновать и разработать оптимальные условия определения количественного содержания *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина титриметрическим (кислотно-основное титрование) и УФ-спектрофотометрическим методами.

4. Определить хроматографическую подвижность, теоретически обосновать и разработать оптимальные условия идентификации и определения количественного содержания *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом капиллярного электрофореза. Провести валидационную оценку разработанной методики.

5. Теоретически обосновать и разработать оптимальные условия идентификации и количественного определения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Провести валидационную оценку разработанной методики.

6. Разработать методики идентификации родственных примесей и примесей остаточных органических растворителей, провести валидацию методик их

количественного определения.

7. Изучить стабильность *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина с использованием стрессовых, долгосрочных и ускоренных испытаний для установления его предварительного срока годности.

8. На основании изученных химических свойств и физико-химических характеристик *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина установить показатели контроля качества и подготовить проект фармакопейной статьи на субстанцию.

### **Научная новизна**

Впервые проведено химико-фармацевтическое изучение нового биологически активного соединения – *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина (VMA-13-15). Определены его физические, физико-химические и химические свойства, а также спектральные характеристики. Разработаны методики определения подлинности *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методами ИК-спектromетрии и УФ-спектрофотометрии, а также с помощью химических реакций. Обоснована возможность использования и подобраны оптимальные условия для количественного определения содержания (VMA-13-15) титриметрическими, оптическими и хроматографическими методами. Разработаны методики идентификации и количественного определения примеси незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она. Проведена идентификация остаточных органических растворителей в фармацевтической субстанции *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом газовой хроматографии. Определена стабильность и установлены предварительные сроки годности VMA-13-15. Разработан проект нормативной документации на фармацевтическую субстанцию *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Проведенные исследования позволили обосновать показатели контроля качества VMA-13-15 с помощью современных методов анализа, которые легли в основу разработанного проекта нормативной документации. Полученные данные могут

служить теоретической базой для разработки методик анализа других производных хиназолина.

### **Методология и методы исследования**

Методология проведенных исследований основана на изучении и обобщении зарубежных и отечественных литературных данных в области фармацевтического анализа производных хиназолина и гуанидина. В ходе исследования были использованы физико-химические методы анализа: ИК-спектроскопия, УФ-спектрофотометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография, газовая хроматография, капиллярный электрофорез. Все результаты, полученные в ходе экспериментальной работы, были статистически обработаны, методики количественного определения валидированы с учетом требований ГФ РФ 14 издания и ГФ РФ 15 издания, а также методических рекомендаций по валидации аналитических методик.

### **Личный вклад автора**

Автором были лично осуществлены все этапы экспериментальных исследований: выбор и обоснование темы диссертации, разработаны цели и задачи работы, проведен поиск и анализ отечественной и зарубежной литературы по теме исследования, составлен план экспериментальной работы. Установлены основные показатели качества *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина: «Температура плавления», «Растворимость», «Потеря в массе при высушивании», «Сульфатная зола», «Тяжелые металлы». Для подтверждения подлинности исследуемой субстанции автором были получены ИК-спектры и установлены характерные полосы поглощения основных функциональных групп, УФ-спектры, а также выбраны химические реакции, подтверждающие наличие функциональных групп и структурных фрагментов *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина. Автором были научно обоснованы, разработаны и валидированы методики количественного анализа нового биологически активного соединения – *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методами УФ-спектрофотометрии, ВЭЖХ, капиллярного электрофореза, а также методом неводного титрования. Установлено содержание остаточных органических

растворителей методом ГХ.

Автором были разработаны методики идентификации и количественного определения примеси незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она методами ВЭЖХ и капиллярного электрофореза. Проведено комплексное изучение стабильности методами стрессовых, ускоренных и долгосрочных испытаний и установление предварительных сроков годности *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина. Автор самостоятельно провел статистическую обработку полученных данных, составил проект нормативной документации на субстанцию *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина. Диссертация и автореферат были подготовлены автором лично.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Результаты изучения химических и физико-химических свойств *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина с целью выбора химических реакций и физико-химических методов для его идентификации.

2. Результаты разработки и валидации методик количественного определения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина при использовании кислотно-основного титрования, методов капиллярного электрофореза, УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ.

3. Результаты разработки и валидации методики идентификации и количественного определения родственной примеси *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методами капиллярного электрофореза и ВЭЖХ.

4. Результаты определения остаточных растворителей методом ГХ.

5. Результаты теоретического исследования с помощью компьютерных технологий процесса деградации *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина.

6. Результаты по установлению сроков годности, обоснованные методами стрессовых, ускоренных и долгосрочных испытаний стабильности *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина.

7. Показатели контроля качества фармацевтической субстанции *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Научные положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия конкретно пункту 2 и 3 научной специальности.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Степень достоверности полученных данных достигнута применением современных методов фармацевтического анализа, таких как инфракрасная спектроскопия, спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой области, ВЭЖХ, капиллярного электрофореза, газовой хроматографии, а также изучением и применением в качестве теоретической базы трудов зарубежных и отечественных ученых. Обработка результатов проводилась с помощью методов математической статистики и валидационной оценки с соблюдением требований ГФ РФ 14 издания и ГФ РФ 15 издания.

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на всероссийских научно-практических конференциях с международным участием «Беликовские чтения» (Пятигорск, 2018, 2021); научно-практической конференции «Синтез и анализ лекарственных средств синтетического и растительного происхождения» (Пятигорск, 2017); международной научно-практической конференции «Проблемы и перспективы в международном трансфере инновационных технологий» (Уфа, 2018).

Апробация работы состоялась на расширенном заседании кафедры фармацевтической химии совместно с проблемной комиссией Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, протокол № 4 от 06.10.2023.

### **Внедрение результатов в практику**

Разработанные методики *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

нашли практическое применение и используются в аналитической группе отдела синтеза и фармацевтических технологий Научного центра инновационных лекарственных средств федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Акт о внедрении от 20.04.2022).

Результаты исследования по теме диссертационной работы использованы при разработке учебно-методического информационного комплекса для аспирантов Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по дисциплине «Фармацевтическая химия и фармакогнозия» (Акт о внедрении от 07.07.2021).

### **Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук**

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научных исследований Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по проблеме «Изыскание и изучение новых лекарственных средств».

### **Публикации по теме диссертации**

По результатам исследования опубликовано 9 работ, в том числе 4 научные статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 2 научные статьи в изданиях, индексируемых в международной базе RSCI; иные публикации по результатам диссертационного исследования – 3.

## Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 165 страницах машинописного текста, содержит 57 таблиц, 36 рисунков, 7 схем. Работа состоит из введения, обзора литературы, главы «Объекты и методы исследования», глав экспериментальной части, заключения, общих выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложений. Список литературы включает 120 источников, в том числе 20 – на английском языке.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили 3 серии (2017, 2019, 2021) лабораторных образцов *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина (лабораторный шифр VMA-13-15, рисунок 1), а также образцы исходного соединения синтеза VMA-13-15, который может обнаруживаться в образцах исследуемом соединении в виде родственной примеси или продукта деструкции (незамещенный хиназолин-4(3*H*)-он). Ввиду отсутствия стандартного образца (СО) использовался дважды перекристаллизованный из метанола и высушенный до постоянной массы полученный ранее образец VMA-13-15 (серия 2017), названный нами условным стандартным образцом (УСО). Хроматографическая чистота УСО была установлена в ходе разработки методики определения родственных примесей методом капиллярного электрофореза и подтверждена методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Определение физико-химических характеристик *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина проводили с учетом требований ГФ РФ 14 издания и ГФ РФ 15 издания.

В исследованиях использовали сертифицированное аналитическое оборудование: спектрофотометр СФ-2000 с программным обеспечением UVWIN для Windows «Аквилон»; «ИК – Фурье спектрометр ФСМ 1201»; рН-метр Hanna Edge 2002-02;

анализатор жидкости «Эксперт-001», снабженный стеклянным комбинированным электродом ЭКС-10601/7; прибор «Капель – 105м»; жидкостной хроматограф DionexUltiMate 3000 со спектрофотометрическим детектором с использованием системы сбора и обработки хроматографических данных Chromeleon, версия 7; газовый хроматограф «Кристалл-2000М»; аналитические весы Госметр ВЛ-124; МС-детектирование осуществляли методом ионизации электрораспылением (ESI) с использованием спектрометра BrukerAmazonSL и другое.

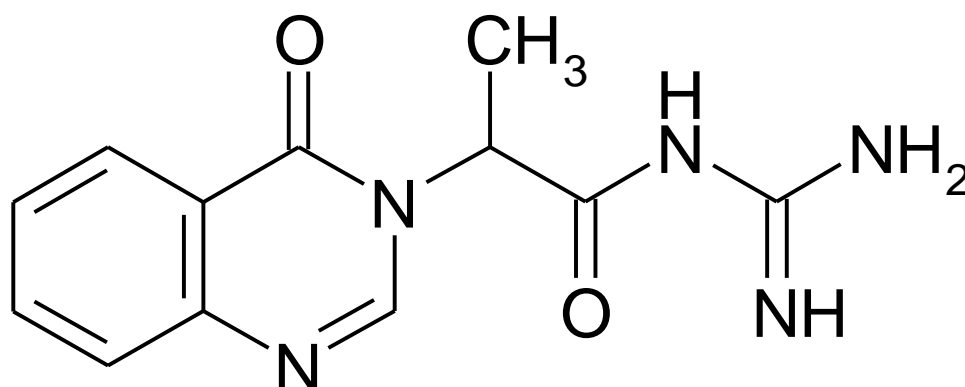


Рисунок 1 – *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидин (VMA-13-15)

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе исследования были установлены и нормированы основные фармакопейные показатели качества *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина (таблица 1).

Таблица 1 – Основные показатели качества VMA-13-15

| Показатель   | Результат   |
|--|---|
| Описание ОФС.1.1.0006.15   | Белый аморфный порошок, без запаха  |
| Растворимость ОФС.1.2.1.0005.15<br>– вода очищенная, 0,1 М раствор кислоты хлористоводородной, 0,1 М раствор натрия гидроксида<br>– спирт этиловый 96%, метанол<br>– диметилформамид, диметилсульфоксид<br>– гексан, ацетон, хлороформ | Растворим 1:30<br><br>Мало растворим 1:1000<br>Умеренно растворим 1:100<br>Практически нерастворим 1:1000 |
| Температура плавления ОФС.1.2.1.0011.18  | В пределах от 268 до 270°C  |
| Ионометрия ОФС.1.2.1.0004.15   | <i>pH</i> в пределах 5,0-6,0  |
| Кислотность или щелочность<br>Индикатор – метиловый красный<br>(переход окраски от желтой к красной)   | Не более 0,15 мл 0,01 М раствора NaOH<br>Не более 0,15 мл 0,01 М раствора HCl                             |

## Продолжение таблицы 1

|   |  |
|---|--|
| Прозрачность (ОФС.1.2.1.0007.15) и степень окраски раствора (ОФС.1.2.1.0006.15) | Раствор прозрачный и не превышает окраску эталона В <sub>9</sub> |
| Потеря в массе при высушивании (ОФС.1.2.1.0010.15)                              | Не более 0,5%  |
| Сульфатная зола и тяжелые металлы (ОФС.1.2.2.2.0014.15)                         | Не более 0,1%<br>Не превышает окраску эталонного раствора        |

На ИК-спектре *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина идентифицированы характеристические полосы валентных колебаний С=C связей ароматического кольца в области 1600–1500 см<sup>-1</sup>, полосы деформационных колебаний С=О связей в области 1660–1590 см<sup>-1</sup>, деформационные полосы С=N в области 1660–1590 см<sup>-1</sup>, а также валентные колебания NH<sub>2</sub>-групп в области 3500–3000 см<sup>-1</sup>.

УФ-спектры поглощения (рисунок 2) УСО *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина, как в воде, в спирте этиловом 96%, так и в натрия гидроксида растворе 0,1 М имеют три максимума поглощения при 226,266 и 302 нм. В хлористоводородной кислоте растворе 0,1 М наблюдается только два максимума поглощения при 227 нм и 273 нм соответственно. Оптические параметры электронных спектров поглощения изучаемого соединения, имеющие четко выраженные значения положения максимумов и минимумов поглощения позволяют их использовать для дополнительной идентификации при создании проекта НД, а именно: УФ-спектр поглощения 0,001% раствора БАС с использованием в качестве растворителя воды очищенной: в области от 200 до 400 нм должен иметь максимумы поглощения при 226+2 нм, 266+2 нм, и 302+2 нм.

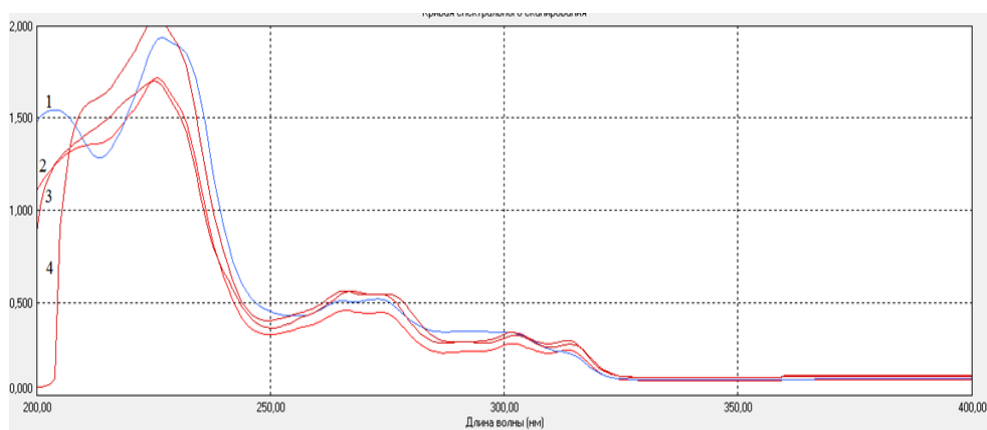


Рисунок 2 – УФ-спектры поглощения растворов УСО в хлористоводородной кислоте растворе 0,1 М (1), воде очищенной (2), в спирте этиловом 96% (3), в натрия гидроксида растворе 0,1 М (4)

Анализ структурной формулы вещества позволил выбрать ряд химических реакций для подтверждения подлинности *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина. Установлена чувствительность реакций методом последовательных разведений. Реакция на определение гуанидинового остатка с *α*-нафтолом и натрия гипобромитом в щелочной среде (аналитический эффект – красное окрашивание) включена в проект НД.

Теоретически обоснованы подходы к количественному определению *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина титриметрическими и спектральными методами. С помощью электронного ресурса [chemicalize.com](http://chemicalize.com) определены константы ионизации (рКа) *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина. Установлено, что исследуемая субстанция имеет константу как кислоты  $pK_1=11,3$  и как основания 2 константы  $pK_3=4.71$  и  $pK_2=8,77$ . Рассчитанные константы подтверждали с помощью потенциометрического титрования. Полученные значения рКа свидетельствуют о наличии амфотерных свойств *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина.

Изучена возможность кислотно-основного титрования субстанции как в водных и спиртовых средах, так и с использованием протогенных и протофильных растворителей. В качестве растворителей использовали уксусную кислоту ледяную, уксусный ангидрид, муравьиную кислоту, а также их смеси. При потенциометрическом титровании скачок наблюдали при использовании **метода неводного титрования** только в среде (уксусной кислоты ледяной). Разработанная методика была оценена по основным валидационным параметрам (таблица 2).

С целью выбора оптимального растворителя для разработки методики количественного определения VMA-13-15 **методом УФ-спектрофотометрии** были рассчитаны относительные погрешности определения значений удельного показателя для каждой длины волны в соответствующем растворителе. Оказалось, что при использовании всех растворителей при всех аналитических длинах волн ошибка определения находилась в пределах от 1,34% до 2,2%. Т.е. относительные погрешности определения свидетельствуют о правильности выбора растворителей, однако с аналитической целью предпочтительней в качестве растворителя выбрать воду, а также спирт этиловый 96%, который позволит определять содержание VMA-13-15 в твердых дозированных лекарственных препаратах. Показано, что спектрофотометрический анализ целесообразнее проводить в максимуме поглощения 266 нм, как для водных

растворов VMA-13-15, так и для спиртовых.

Результаты валидационной оценки разработанной методики приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты валидации методик количественного определения *N*-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом неводного титрования и УФ-спектрофотометрии

| Параметр                          | Неводное титрование  | УФ-спектрофотометрия  |  |
|-----------------------------------|--|---|--|
|                                   |  | Водный р-р  | Спиртовой р-р  |
| Специфичность                     | Отсутствие влияния растворителя на результаты титрования испытуемого раствора                        | Соответствие положения максимумов растворов VMA-13-15 и УСО                                       |  |
| Линейность                        | $y=74,18x+0,140$<br>$r=0,9987$   | $y=228,1x-0,022$<br>$r=0,9979$  | $y=246,7x+0,024$<br>$r=0,9942$   |
| Правильность                      | $(a \leq \Delta a = t(95\%; 5) \times s_a)$<br>$0,140 < 0,49 \times 0,15$                            | $\bar{R}=100,28$ ; $S=0,66$ ;<br>$RSD\bar{x}=0,7\%$   | $\bar{R}=100,39$ ; $S=1,3$ ;<br>$RSD\bar{x}=1,3\%$   |
| Прецизионность<br>(Повторяемость) | $\bar{x}=99,79\%$<br>$S=0,75$<br>$RSD\bar{x}=0,75\%$<br>$\Delta\bar{x}=0,79$<br>$\varepsilon=0,79\%$ | $\bar{x}=100,11\%$<br>$S=1,29$<br>$RSD\bar{x}=1,29$<br>$\Delta\bar{x}=1,36$<br>$\varepsilon=1,36$ | $\bar{x}=99,79\%$<br>$S=1,40$<br>$RSD\bar{x}=1,40\%$<br>$\Delta\bar{x}=1,47$<br>$\varepsilon=1,47\%$ |
| Аналитическая область             | 0,0859–0,1198 г  | 0,001–0,004%  | 0,001–0,004%   |

Проведенная валидационная оценка позволяет утверждать, что методики валидны по всем показателям и могут быть использованы для количественного определения БАС как в субстанции, так и лекарственных препаратах.

Исходя из схемы синтеза и структуры анализируемой субстанции в качестве родственной примеси, можно предположить наличие исходного соединения – незамещенного хиназолин-4(3H)-она, из-за возможной неполноты протекания реакции. Подобранные условия анализа оказались пригодными для разработки методик идентификации и нормирования количественного содержания БАС и родственных примесей (незамещенного хиназолин-4(3H)-она) методом капиллярного электрофореза (КЭ).

При использовании метода КЭ выбор буферного раствора и исходных параметров прибора осуществляли исходя из физико-химических свойств субстанции и анализа литературных источников. Подготовленные для предварительных исследований пробы испытуемых образцов вводили в систему капиллярного электрофореза «Капель – 105м» (ОАО «Люмэкс-маркетинг», Россия) при условиях анализа, описанных в таблице 3.

Таблица 3 – Условия анализа для определения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом капиллярного электрофореза

| Показатель                | Условия анализа                 |
|---------------------------|---------------------------------|
| Буфер                     | Боратный (рН 9,2)               |
| Температура               | +20°C                           |
| Напряжение                | +20 кВ                          |
| Время анализа             | 10 мин                          |
| Длина волны               | 268 нм                          |
| Капилляр кварцевый, длина | 60 см (эффективная длина 50 см) |
| Диаметр                   | 75 мкм                          |
| Ввод пробы                | Гидродинамически, 30 мбар       |

Выбранные условия определения (таблица 3) оказались пригодными для анализа *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина и его примеси, так как на электрофореграммах четко видны симметричные пики с оптимальным временем миграции в пределах 7 минут (рисунок 3.1) и в пределах 4,4 минуты.

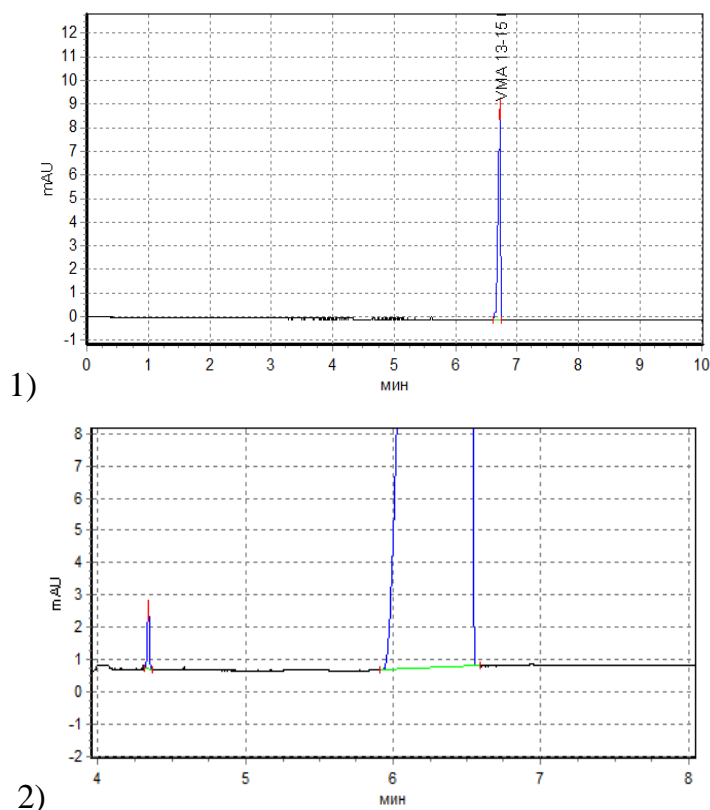


Рисунок 3 – Электрофореграммы условного стандартного образца VMA-13-15 (1) и модельной смеси VMA-13-15 и незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она (2)

Нами оценены следующие параметры предлагаемой методики: время миграции, разрешение между пиками ( $R_s$ ), фактор симметричности пиков ( $A_s$ ), кажущееся число теоретических тарелок ( $N$ ), относительное стандартное отклонение площадей пиков

(RSD, %), значения которых рассчитаны по результатам 6 электрофореграмм с использованием программного обеспечения «Эльфоран» (таблица 4).

Таблица 4 – Параметры пригодности хроматографической системы

| Вещество           | Время миграции, мин | Rs  | As  | N      | RSD, % |
|--------------------|---------------------|-----|-----|--------|--------|
| Хиназолин-4(3H)-он | 4,37                | 5,8 | 0,2 | 160329 | 1,47   |
| VMA-13-15          | 6,59                |     | 0,1 | 102974 | 1,07   |

Валидационная оценка, проведенная с использованием модельных растворов, подтверждает пригодность разработанных методик (таблица 5). Установлен предел содержания примеси не более 0,1%.

Таблица 5 – Результаты валидации методик количественного определения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина и незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она методом капиллярного электрофореза

| Параметр                       | <i>N</i> -[2-[4-оксо-3(4 <i>H</i> )-хиназолинил]пропионил]-гуанидин                        | Незамещенного хиназолин-4(3 <i>H</i> )-она  |
|--------------------------------|--|---|
| Специфичность                  | Отсутствие посторонних пиков на хроматограмме УСО  | Полное разделение пиков VMA-13-15 и незамещенного хиназолин-4(3 <i>H</i> )-она              |
| Линейность                     | $y=7070,3x+0,25$<br>$r=0,9977$   | $y=192,52x+0,71$<br>$r=0,9977$  |
| Правильность                   | $(a \leq \Delta a = t(95\%; 5) \times s_a)$<br>$0,25 \leq 20,50 \times 6,44$               | $(a \leq \Delta a = t(95\%; 5) \times s_a)$<br>$0,71 \leq 3,11 \times 0,98$                 |
| Прецизионность (Повторяемость) | $\bar{x}=99,63$ $S_{\bar{x}}=0,53$<br>$S=1,31$ $\varepsilon=1,39\%$<br>$RSD\bar{x}=1,31\%$ | $\bar{x}=0,0998$ $S_{\bar{x}}=0,53$<br>$S=1,31$ $\varepsilon=1,09\%$<br>$RSD\bar{x}=1,31\%$ |
| Аналитическая область          | 0,01–0,05 мг/мл  | 1–5 мкг/мл  |
| ПО; ПКО                        |  | ПО=0,016 мкг/мл;<br>ПКО=0,050 мкг/мл  |

Выбор условий хроматографического исследования методом **ВЭЖХ** начинали с подбора состава подвижной фазы, оптимальной для обнаружения, как исследуемой субстанции, так и возможных примесных соединений. В результате было установлено, что наиболее оптимальной является система ацетонитрил – 0,5% муравьиная кислота в соотношении 20:80, так как полученные пики на хроматограмме симметричны и четко разделены между собой (рисунок 4). Выбранная длина волны детектирования была установлена в ходе спектрофотометрического анализа.

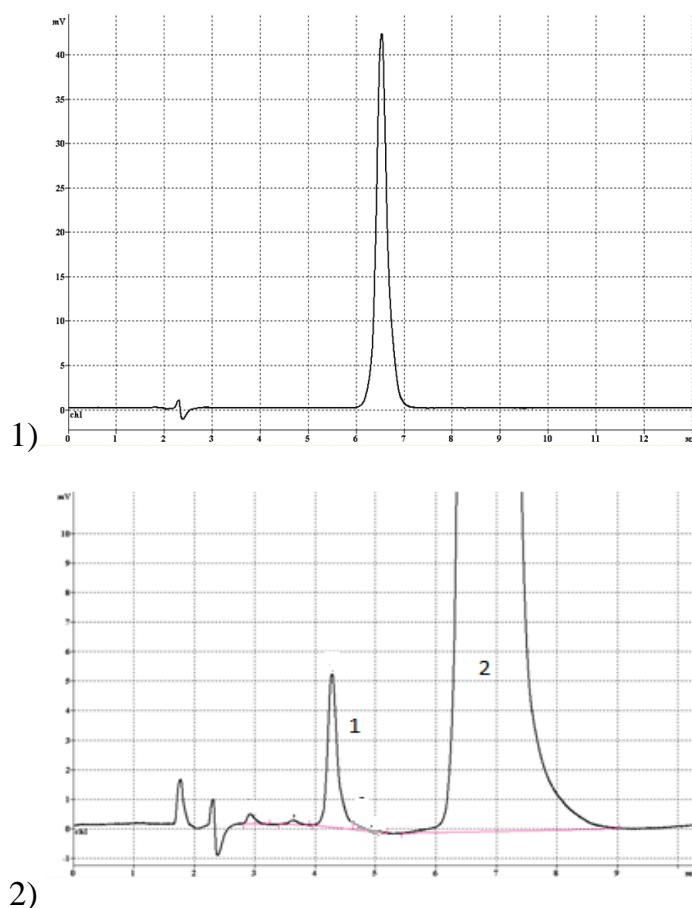


Рисунок 4 – Хроматограмма условного стандартного образца VMA-13-15 (1) и хроматограмма модельной смеси VMA-13-15 и незамещенного хиназолин-4(3H)-она (2)

Была подтверждена хроматографическая пригодность выбранных условий. На основании выбранных условий были разработаны методики идентификации и количественного определения *N*-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина и предполагаемой примеси незамещенного хиназолин-4(3H)-она в субстанции VMA-13-15. Разработанные методики количественного определения валидированы по основным валидационным параметрам. Нормировано содержание примеси не более 0,1%.

Таблица 6 – Результаты валидации методик количественного определения *N*-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина и незамещенного хиназолин-4(3H)-она методом ВЭЖХ

| Параметр      | <b>N</b> -[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидин                   | <b>Незамещенного хиназолин-4(3H)-она</b>                                  |
|---------------|--|---|
| Специфичность | Отсутствие посторонних пиков на хроматограмме УСО                            | Полное разделение пиков VMA-13-15 и незамещенного хиназолин-4(3H)-она     |
| Линейность    | $y=28365x-22,363$<br>$r=0,9988$  | $y=49704x-2,964$<br>$r=0,9965$  |
| Правильность  | $(a \leq \Delta a = t(95\%; 5) \times s_a)$<br>$22,63 < 56,75 \times 17,834$ | $(a \leq \Delta a = t(95\%; 5) \times s_a)$<br>$2,964 < 8,96 \times 2,81$ |

Продолжение таблицы 6

|                                   |  |   |
|-----------------------------------|--|---|
| Прецизионность<br>(Повторяемость) | $\bar{x}=99,78$ $S_{\bar{x}}=0,49$<br>$S=1,20$ $\varepsilon=1,26\%$<br>$RSD\bar{x}=1,20\%$ | $\bar{x}=0,1018$ $S_{\bar{x}}=0,0015$<br>$S=0,0037$ $\varepsilon=3,83\%$<br>$RSD\bar{x}=3,63\%$ |
| Аналитическая<br>область          | 0,015–0,045 мг/мл  | 0,0005–0,0025 мг/мл   |
| ПО; ПКО                           |  | ПО=0,18 мкг/мл;<br>ПКО=0,57 мкг/мл  |

Выбраны оптимальные условия определения возможных примесей остаточных органических растворителей (диэтилового эфира и метанола) **методом газовой хроматографии** на приборе – «Кристалл-2000М», используя следующие условия хроматографирования: колонка насадочная – ZB-FFAP, 50 м 0,32 мм 0,5 нм; газ носитель – азот ОСЧ 99,996%; скорость потока – 10 мин; объем вводимой пробы – 1 мкл; температура колонки – 160°C; температура испарителя – 180°C; температура детектора – 220°C; давление газа – 65 кПа; длина колонки – 50 м; диаметр колонки – 0,32 мм. Разработаны методики идентификации и количественного определения с использованием стандартных растворов искомым растворителей. Методика валидирована по основным валидационным характеристикам. Установлено присутствие метанола и диэтилового эфира в следовых количествах.

Определение предполагаемых продуктов деградации проводили методом стрессовых испытаний, используя методы капиллярного электрофореза и масс-спектрологии. Изучение молекулы исследуемого *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина и использование компьютерных технологий позволили спрогнозировать возможные процессы деструкции, среди которых наиболее вероятной может быть реакция гидролиза при термостатировании раствора исследуемого соединения в щелочной среде.

Предположительно соединение VMA-13-15 устойчиво в кислой среде. При невысоких значениях температур оно образует дизамещенную соль. В схеме 1 (рисунок 5) приведена реакция образования соли дигидрохлорида на примере взаимодействия VMA-13-15 с хлористоводородной кислотой. Так как хлористоводородная кислота является сильной, то, согласно теории электролитической диссоциации Аррениуса-Оствальда, она существует в водной среде в виде аниона хлора и гидроксония, который и участвует в протонировании соединения VMA-13-15.

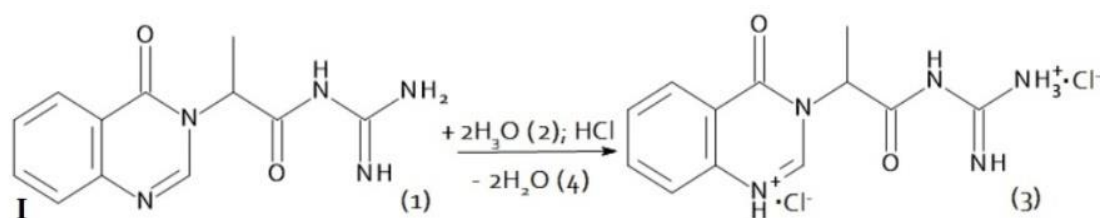


Рисунок 5 – Схема образования диаминозамещенной соли соединения VMA-13-15 в слабокислой среде

При длительном воздействии кислой среды и повышении температуры происходит реакция гидролиза, при этом хлористоводородная кислота участвует в протонировании продуктов гидролиза с образованием солей (рисунок 6).

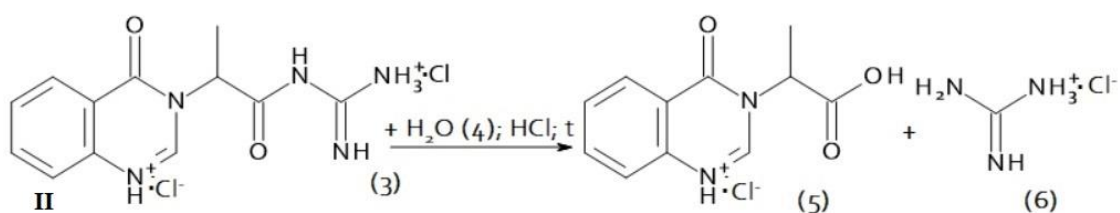


Рисунок 6 – Схема гидролиза соединения VMA-13-15 в сильнокислой среде

В слабощелочной среде (рисунок 7) прогнозируется, что соединение также подвергается гидролизу с образованием соли. Кроме того, известно, что производные гуанидина могут в щелочной среде конденсироваться до производного бигуанида (реакция VI). Примеры предполагаемого радикального окисления приведены в реакции V.

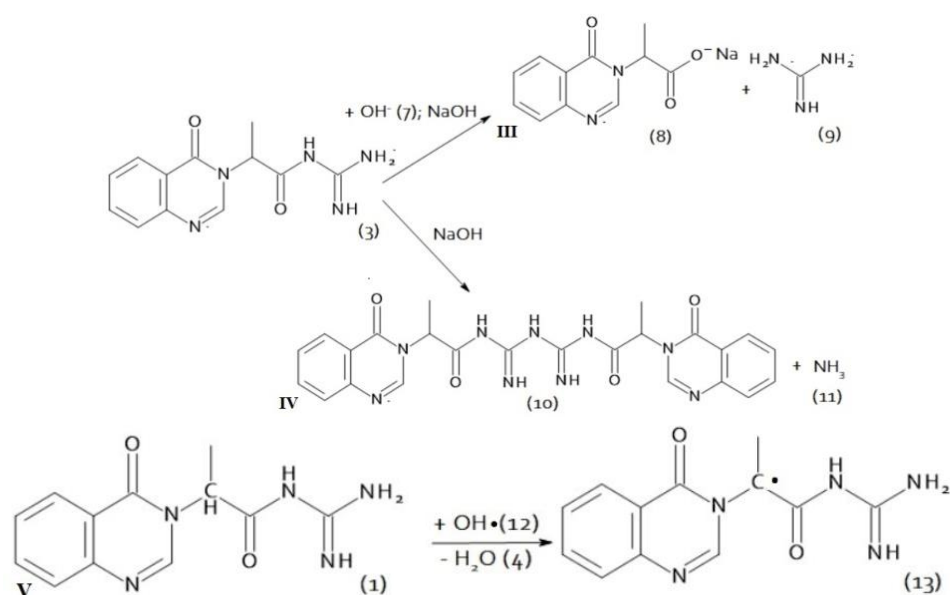


Рисунок 7 – Схема гидролиза (III), конденсации (IV) соединения VMA-13-15 в слабо- и сильнощелочной среде и радикального окисления (V)

Оптимизация геометрии рассматриваемых структур проводилась с использованием метода молекулярной механики ММ+ в программе HyperChem 8.0.9. Завершающей пространственной оптимизации геометрии молекул был использован метод теории функционала плотности *ub3lyp* с базисными наборами 6-311G\*\*. Результирующий колебательный анализ изучаемых термодинамических характеристик проводился в программе *Ogса*, которая позволила получить значения энтальпий и энтропий для изучаемых соединений.

Таблица 7 – Значения энтальпии, энтропии, энергии Гиббса и константы равновесия моделируемых реакций при нормальных условиях для предложенных реакций деструкции (рисунки 5-7)

| Номер реакции | Энтальпия $\Delta H$ , кДж/моль | Энтропия $\Delta S$ , кДж/моль $\times$ К | Энергия Гиббса ( $\Delta G$ ), кДж/моль | Константа равновесия (K) |
|---------------|---------------------------------|---|---|--------------------------|
| I             | -148,0780                       | -0,0049                                   | -146,7400                               | $1,1958 \times 10^{28}$  |
| II            | -201,6390                       | 0,0414                                    | -212,9410                               | $5,5560 \times 10^{40}$  |
| III           | -354,9670                       | -0,2691                                   | -281,5030                               | $7,3035 \times 10^{53}$  |
| IV            | 24,4170                         | -0,0130                                   | 27,9660                                 | $4,4557 \times 10^{-6}$  |
| V             | -69,8390                        | -0,0115                                   | -66,6995                                | $5,7870 \times 10^{12}$  |

Методом капиллярного электрофореза проведен анализ продуктов деградации водного раствора исследуемого соединения посредством «стресс-тестов», которыми изучалось влияния термического воздействия на VMA-13-15 в воде и в присутствии раствора кислоты хлористоводородной 0,1 М и раствора натрия гидроксида 0,1 М. Установлено, что наибольшее влияние на стабильность *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина оказывает щелочная среда, как и предполагалось по результатам вычислительного эксперимента. Изучен масс-спектр обнаруженного при термостатировании в щелочной среде продукта деградации. По совпадению молярной массы и времени выхода было подтверждено, что примесь на хроматограммах *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина является незамещенным хиназолин-4(3*H*)-оном – исходным продуктом синтеза.

Изучена и обоснована стабильность исследуемой субстанции методом «ускоренного» старения. Установлен предварительный сроки годности – 2 года. Данный срок годности подтвержден в условиях долгосрочных испытаний стабильности исследуемой субстанции. Рассчитан температурный режим хранения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина.

На основании выполненных исследований разработаны методики анализа и

установлены нормы качества нового биологически активного соединения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина, которые явились основой для создания проекта фармакопейной статьи.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенного комплексного фармацевтического исследования предложено решение актуальной научно-практической задачи и стандартизации по основным физическим, химическим и физико-химическим показателям нового биологически активного соединения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина (VMA-13-15). На основании изученных химических свойств и физико-химических характеристик БАС установлены показатели контроля качества и подготовлен проект фармакопейной статьи на субстанцию. Полученные результаты приведены в общих выводах.

## ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Изучены физико-химические свойства *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина, послужившие основой нормируемых фармакопейных показателей качества субстанции, включенных в проект НД. Установлено, что соединение растворимо в водных растворах, ДМФА, мало растворимо в метаноле и спирте этиловом и практически нерастворимо в неполярных растворителях. Интервал температуры плавления находится в пределах от 268°C до 270°C.

2. Обоснована возможность использования методов ИК-спектromетрии по совпадению положения и интенсивности полос поглощения со спектром УСО и УФ-спектрофотометрии (УФ-спектр поглощения водного раствора БАС должен иметь максимумы поглощения при 226+2 нм, 266+2 нм, и 302+2 нм), а также качественной реакции на остаток гуанидина для идентификации и подтверждения подлинности *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина.

3. Разработаны и валидированы методики количественного определения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методами кислотно-основного

титрования в среде уксусной кислоты ледяной с потенциометрическим определением точки эквивалентности и УФ-спектрофотометрии с использованием в качестве растворителя воды очищенной или спирта этилового 96%.

4. Оптимизированы условия определения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом капиллярного электрофореза: электролит – боратный буферный раствор 0,01 М с рН 9,2, длина волны 268 нм и доказана их пригодность для определения подлинности и количественного содержания исследуемой субстанции.

5. Разработаны и валидированы методики количественного определения содержания основного вещества методом ВЭЖХ: сорбент октадецилсиликагель, подвижная фаза ацетонитрил – 0,5% муравьиная кислота в соотношении 20:80, изократический режим, скорость потока элюента 1,0 мл в минуту и длина волны детектирования 254 нм.

6. Доказана возможность использования методов ВЭЖХ и КЭ для определения и установления количественного содержания родственной примеси – незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она. Разработана и валидирована методика его количественного определения. Нормировано содержание примеси не более 0,1%. Разработана методика количественного определения остаточных органических растворителей методом газовой хроматографии на модельных смесях с использованием стандартных растворов искомым растворителей. Методика валидна и позволяет определять содержание метанола и диэтилового эфира в количестве не более 0,5%.

7. Изучена стабильность молекулы исследуемого *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина и на основе компьютерных технологий спрогнозированы возможные процессы деструкции, среди которых наиболее вероятным может быть реакция гидролиза при термостатировании раствора исследуемого соединения в щелочной среде. Прогностические данные экспериментально подтверждены методом капиллярного электрофореза путем анализа деградации водного раствора исследуемого соединения посредством «стресс-тестов». Установлен предварительный срок годности – 2 года при температуре не выше 25 градусов.

8. Установлены нормы качества и оформлен проект НД на субстанцию *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина на основании полученных результатов и нормативных требований.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты, представленные в диссертационной работе, позволяют рекомендовать *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидин для дальнейшего более глубокого фармацевтического анализа с целью разработки на его основе кардиопротекторных и нейропротекторных лекарственных средств и внедрения их в промышленное производство.

## ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Перспективой развития темы является разработка эффективных лекарственных средств на основе *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина, обладающих кардиопротекторным и нейропротекторным действием, с целью решения актуальных проблем медицинской практики в борьбе с патологиями сердечно-сосудистой системы.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Луценко, Д.Н.** Валидационная оценка методики количественного определения субстанции *N* - [2 - [4 - оксо - 3(4*H*) - хиназолинил]пропионил] - гуанидина методом УФ - спектрофотометрии / **Д.Н. Луценко** // Проблемы и перспективы в международном трансфере инновационных технологий: сборник статей Международной научно-практической конференции (25 сент. 2018 г.). – Уфа: Аэтерна, 2018. – С. 93-98.
2. **Луценко, Д.Н.** Изучение физико-химических свойств субстанции нового биологически активного соединения производного хиназолин-4(3*H*)-она / **Д.Н. Луценко, Е.В. Компанцева** // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сборник научных трудов. – Пятигорск, 2018. – Вып. 73. – С. 24-26.
3. **Компанцева, Е.В.** Разработка и валидация методики количественного определения биологически активного соединения *n*-(2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил)гуанидина / **Е.В. Компанцева, Д.Н. Луценко, А.А. Глушко** // **Аспирантский вестник Поволжья.** – 2019. – № 5-6. – С. 122-127.

4. Компанцева, Е.В. Спектрофотометрическое определение нового биологически активного соединения кардиопротекторного действия / Е.В. Компанцева, Д.Н. Луценко // *Материалы VII Всероссийской научно-практической конференции.* – Пятигорск, 2019. – С. 246-252.

5. Компанцева, Е.В. Определение биологически активного соединения N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом капиллярного электрофореза / Е.В. Компанцева, Д.Н. Луценко, Е.Р. Гарсия // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.** – 2020. – Т. 23, № 10. – С. 40-45.

6. Изучение возможности идентификации нового биологически активного вещества кардиопротекторного действия / Е.В. Компанцева, Д.Н. Луценко, И.П. Кодониди, Н.М. Червонная // **Вестник Смоленской государственной медицинской академии.** – 2020. – Т. 19, № 2. – С. 185-190.

7. Компанцева, Е.В. Определение остаточных органических растворителей в новом кардиопротекторном соединении методом газовой хроматографии / Е.В. Компанцева, Д.Н. Луценко, М.В. Ларский // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.** – 2021. – Т. 24, № 10. – С. 52-58.

8. Разработка и валидация методики количественного определения нового биологически активного соединения N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом титрования в неводной среде / Д.Н. Луценко, Е.В. Компанцева, А.С. Чиряпкин, Л.С. Ушакова // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.** – 2023. – Т. 26, № 9. – С. 33-38. [RSCI]

9. Разработка методики определения родственной примеси в новом биологически активном соединении кардиопротекторного действия методом капиллярного электрофореза / Е.В. Компанцева, Д.Н. Луценко, Е.Р. Гарсия, А.А. Озеров, Т.М. Дементьева // **Человек и его здоровье.** – 2023. – Т. 26, № 2. – С. 73-79. [RSCI]

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВАК – Высшая аттестационная комиссия,

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография,

ГФ РФ 14 издания – Государственная фармакопея Российской Федерации

XIV издания,

ГФ РФ 15 издания – Государственная фармакопея Российской Федерации

XV издания,

ГХ – газовая хроматография,

УФ – ультрафиолетовая область спектра,

ИК – инфракрасная область спектра,

НД – нормативный документ,

ОФС – общая фармакопейная статья,

ПКО – предел количественного определения,

ПО – предел обнаружения.