

УДК 615.07



ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ СУБСТАНЦИИ 3-[2-(4-ФЕНИЛ-1-ПИПЕРАЗИНО)-2-ОКСОЭТИЛ]ХИНАЗОЛИН-4(3H)-ОНА В СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ

Т.А. Гендугов¹, А.А. Глушко¹, А.А. Озеров², Л.И. Щербакова¹

¹ Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России
357532, Россия, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11

² ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России
400131, Россия, г. Волгоград, площадь Павших Борцов, 1

E-mail: timbirlei2008@rambler.ru

Получено 14.01.2020

Рецензия (1) 16.04.2020

Рецензия (2) 26.06.2020

Принята к печати 05.08.2020

Цель работы – изучение стабильности новой фармацевтической субстанции 3-[2-(4-фенил-1-пиперазино)-2-оксоэтил]хиназолин-4(3H)-она под воздействием стресс-условий.

Материалы и методы. Исследование выполнено в соответствии с рекомендациями руководства ICH. Объектом исследования было ранее не изученное производное хиназолин-4(3H)-она: 3-[2-(4-фенил-1-пиперазино)-2-оксоэтил]хиназолин-4(3H)-он, синтезированное в Волгоградском государственном медицинском университете. Было использовано лабораторное оборудование: ВЭЖХ-хроматограф, ВЭЖХ-МС, центрифуга, электронные весы, pH-метр, термостат, лабораторные фильтры. Вычислительный эксперимент проводился на компьютере с процессором Intel Xeon E3-1230 с использованием программ ORCA 4.1. и GROMACS 2019.

Результаты. Изучено и определено влияние неблагоприятных факторов внешней среды, таких как: высокая температура, свет, действие окислителей, гидролиза в кислой и щелочной среде на стабильность исследуемого вещества. Результаты компьютерного прогнозирования стабильности были подтверждены с помощью ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС, а также определены продукты деструкции субстанции в стрессовых условиях. Проведенные исследования показали, что исследуемое вещество стабильно к воздействию УФ-облучения при длине волны 365 нм, повышенной температуры (80°C), действию окислителей и нестабильно к гидролизу: в щелочной среде натрия гидроксида 1M происходит разрыв по амидной группе с образованием 2-(4-оксохиназолин-3-ил)уксусной кислоты и 1-фенилпиперазина; а в кислой среде кислоты хлористоводородной 1M также происходит деструкция, но она значительно снижается, предположительно, за счет протонирования и стабилизации третичных атомов азота в молекуле.

Заключение. Проведенные исследования позволяют сделать вывод о том, что исследуемая субстанция 3-[2-(4-фенил-1-пиперазино)-2-оксоэтил]хиназолин-4(3H)-он стабильна к агрессивным факторам внешней среды, за исключением гидролиза в щелочной среде, что в дальнейшем будет учитываться при составлении нормативной документации этой фармацевтической субстанции.

Ключевые слова: производное хиназолин-4(3H)-она, фармацевтическая субстанция, стресс-тестирование, моделирование стресс-тестов, термолиз, фотолиз, гидролиз, высокоэффективная жидкостная хроматография, фотостабильность, термостабильность, GROMACS, ORCA

Список сокращений: Государственная фармакопея (ГФ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС), ультрафиолетовое излучение (УФ-излучение).

STUDY OF THE STABILITY OF THE SUBSTANCE 3-[2-(4-PHENYL-1-PIPERAZINO)-2-OXOETHYL]QUINAZOLINE-4(3H)-ONE UNDER STRESSFUL CONDITIONS

Т.А. Gendugov¹, А.А. Glushko¹, А.А. Ozerov², L.I. Shcherbakova¹

¹ Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University
11, Kalinin Ave., Pyatigorsk, Russia 357532

² Volgograd State Medical University
1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russia 400131

E-mail: timbirlei2008@rambler.ru

Received 14 January 2020

Review (1) 16 April 2020

Review (2) 26 June 2020

Accepted 05 August 2020

Для цитирования: Т.А. Гендугов, А.А. Глушко, А.А. Озеров, Л.И. Щербакова. Изучение стабильности субстанции 3-[2-(4-фенил-1-пиперазино)-2-оксоэтил]хиназолин-4(3H)-она в стрессовых условиях. *Фармация и фармакология*. 2020;8(4):242-254. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-4-242-254

© Т.А. Гендугов, А.А. Глушко, А.А. Озеров, Л.И. Щербакова, 2020

For citation: T.A. Gendugov, A.A. Glushko, A.A. Ozerov, L.I. Shcherbakova. Study of the stability of the substance 3-[2-(4-phenyl-1-piperazino)-2-oxoethyl]quinazoline-4(3H)-one under stressful conditions. *Pharmacy & Pharmacology*. 2020;8(4):242-254. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-4-242-254

The aim of the research was to study the stability of a new pharmaceutical substance 3-[2-(4-phenyl-1-piperazino)-2-oxoethyl]quinazoline-4(3H)-one under stress conditions.

Materials and methods. The study was conducted in accordance with the recommendations of the ICH guidelines. The object of the study was a previously unknown derivative of quinazoline-4(3H)-one: 3-[2-(4-phenyl-1-piperazino)-2-oxoethyl]quinazoline-4(3H)-one synthesized in Volgograd state medical university. The following laboratory equipment was used: HPLC chromatograph, HPLC-MS, centrifuge, electronic scales, pH meter, thermostat, laboratory filters.

The computational experiment was conducted on a computer with an Intel Xeon E3-1230 processor using the programs ORCA 4.1. and GROMACS 2019.

Results. The influence of the most unfavorable environmental factors, such as high temperature, light, oxidants, hydrolysis in acidic and alkaline environments, affect the stability of the test substance. The results of the computer-based stability prediction were confirmed by HPLC and HPLC-MS, and the degradation products of the substance under stressful conditions were determined. The conducted studies showed that the test substance is stable to UV radiation at the wavelength of 365 nm, at the elevated temperature (80°C), to the action of oxidants. But it is unstable to hydrolysis: in an alkaline medium of sodium hydroxide 1M, a break in the amide group occurs with the formation of 2-(4-oxoquinazoline-3-yl)acetic acid and 1-phenylpiperazine. And in an acidic environment, hydrochloric acid 1M is also destroyed, but it is significantly reduced, presumably due to the protonation and stabilization of tertiary nitrogen atoms in the molecule.

Conclusion. The conducted research makes it possible to conclude that the test substance 3-[2-(4-phenyl-1-piperazino)-2-oxoethyl]quinazoline-4(3H)-one is stable to aggressive environmental factors, with the exception of hydrolysis in an alkaline environment that will be further considered in the preparation of regulatory documents for this pharmaceutical substance.

Keywords: quinazoline-4(3H)-one derivative, pharmaceutical substance, stress testing, stress test modeling, thermolysis, photolysis, hydrolysis, high-performance liquid chromatography, photostability, thermal stability, GROMACS, ORCA

Abbreviations: State Pharmacopoeia (SF), high performance liquid chromatography (HPLC), high performance liquid chromatography with mass spectrometry (HPLC-MS), ultraviolet radiation (UV radiation).

ВВЕДЕНИЕ

Стрессовые испытания лекарственных средств представляют собой искусственно воссозданные неблагоприятные условия окружающей среды с целью установления продуктов их деградации (деструкции). Используют различные факторы, ускоряющие скорость химических реакций: высокие температуры, свет (в ультрафиолетовой и видимой области спектра), повышенная влажность, изменение показателей кислотности/щелочности среды, воздействие различных окислителей и других компонентов воздуха. Изучение и анализ продуктов деструкции и полураспада лекарственных средств при стресс-тестировании необходимо учитывать при разработке методик определения посторонних примесей, количественного определения, производства, хранения, транспортировки и других разрабатываемых нормативных документов на то или иное лекарственное средство [1].

Результаты стресс-тестов также позволяют оценить влияние кратковременных отклонений от заявленных условий хранения и различные пути деструкции исследуемых веществ, установить наиболее неблагоприятный фактор внешней среды, к которому более чувствительно исследуемое вещество. Данные о стабильности лекарственных субстанций к воздействию компонентов воздуха также позволяют более рационально подойти к вопросу о выборе ее первичной упаковки [2–4].

В частности, ОФС.1.1.0009.18 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств» Государственной Фармакопеи Российской Федерации XIV издания указывает на то, что изучение стабильности лекарственных средств должно включать стрессо-

вые, ускоренные и долгосрочные испытания, а также особое внимание необходимо обращать на разработку программы изучения стабильности новых лекарственных средств. Для новых фармацевтических субстанций ГФ XIV издания стрессовые испытания рекомендует проводить в обязательном порядке [1].

ЦЕЛЬ работы – изучение стабильности новой фармацевтической субстанции 3-[2-(4-фенил-1-пиперазино)-2-оксоэтил]хиназолин-4(3H)-она под воздействием стресс-условий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в соответствии с рекомендациями руководства ICH и ГФ XIV издания [1, 5].

Объектом исследования была одна серия субстанции 3-[2-(4-фенил-1-пиперазино)-2-оксоэтил]хиназолин-4(3H)-она (лабораторный шифр: VMA-10-21), синтезированной в Волгоградском государственном медицинском университете. Структурная формула представлена на рисунке 1.

Исследования методом ВЭЖХ проводились с использованием системы UltiMate 3000 («Dionex», США) со спектрофотометрическим детектором с рабочим диапазоном длин волн от 190 до 900 нм. Сбор и обработка данных проводилась с использованием системы сбора и обработки хроматографических данных Chromeleon, версия 7 («Dionex», США). В работе показано, что при использовании в качестве подвижной фазы ацетонитрила и 0,05 М кислоты фосфорной pH=3,5 в соотношении (25:75) удается обеспечить оптимальные условия хроматографирования. Параметры эксперимента были следующие:

хроматографическая колонка из нержавеющей стали LunaC18 размером 150×4,6 мм с размером частиц 5 мкм, скорость потока 1 мл/мин, температура колонки 25°C, детектирование при 226 нм, объем вводимой пробы 20 мкл, время анализа 40 минут. Анализ ВЭЖХ-МС проводили на масс-спектрометре Bruker (Германия) путем ионизации электроспреем в режиме «Positive». Термостатирование образцов осуществлялось в термостате ТС-1/20 СПУ (Россия).

В качестве подвижной фазы нами был выбран ацетонитрил и 0,05М раствор кислоты фосфорной в соотношении 25:75, со значение рН 3,5±0,05. Водный раствор кислоты фосфорной доводили до указанного значения рН путем добавления раствора триэтиламина. Контроль рН осуществлялся потенциометрически. Центрифугирование проб перед ВЭЖХ анализом проводилось на центрифуге лабораторной с принадлежностями SIGMA 2-16P (Германия). Все растворы проб перед помещением их в прибор, центрифугировались при 8000 мин⁻¹, в течение 3 мин. Испытуемые растворы предварительно фильтровались через NylonMembrane, 0,2 μm 25 mm Syringe Filters (США). Взвешивание образцов проводилось на весах лабораторных электронных ЛВ 210-А, (Россия). Измерение величины рН растворов осуществлялось с использованием рН-метра рН-150МИ (Россия). Все растворители и реактивы, используемые в исследовании, соответствовали требованиям ОФС.1.3.0001.15 ГФ XIV изд.

Компьютерное моделирование стресс-тестов проводилось на рабочей станции с процессором IntelXeon E3-1230 и 16 Гб оперативной памяти. Оптимизация геометрии субстанции VMA-10-21 проводилась в программе ORCA 4.1. методом теории функционала плотности (UB3LYP) с применением базиса 3-21G*. Для изучения структуры твёрдого агрегатного состояния исследуемого вещества проводилось моделирование молекулярной динамики методом молекулярной механики в силовом поле CHARMM36 с использованием программы GROMACS 2019 [6,7]. Для параметризации молекулы исследуемого вещества был использован интернет-сервис SwissParam [8]. В моделируемую систему были включены 10 молекул исследуемого вещества, расположенные в случайном порядке. Далее производилась оптимизация геометрии градиентным методом.

Для изучения влияния температуры на стабильность субстанции VMA-10-21 точную навеску (около 50 мг) помещали в коническую колбу вместимостью 100 мл, добавляли 50 мл спирта этилового 95%, помещали на ультразвуковую ванну на 15 минут до полного растворения субстанции. Полученный раствор кипятили в колбе с обратным холодильником на термостатируемой водяной бане (температура 80°C) в течение 3 часов, отбирая пробы каждые 45 минут. С целью поиска структуры твёрдого состояния производилось моделирование молекулярной динамики с использованием имитации отжига со

снижением температуры от 1000 К до 273 К в течение 200 нс с применением термостата Нозе-Гувера [9]. Далее из полученной структуры с целью изучения устойчивости исследуемого вещества к термолитизу было проведено моделирование молекулярной динамики системы из четырёх молекул с использованием неограниченного метода Хартри-Фока с базисным набором 3-21G* в течение 5000 фс с шагом 1 фс в программе ORCA 4.1. [10]. Термостатирование осуществлялось путём масштабирования скоростей с температурой 400 К и сферическими граничными условиями постоянного объёма.

Изучение влияния УФ-света на стабильность субстанции VMA-10-21 проводили следующим методом: точную навеску (около 50 мг) помещали в коническую колбу из кварцевого стекла вместимостью 100 мл, добавляли 50 мл спирта этилового 95%, помещали на ультразвуковую ванну на 15 минут до полного растворения субстанции. Полученный раствор подвергали воздействию УФ-света при длине волны 365 нм, источник облучения полностью соответствовал требованиям ИСН. Отбор проб осуществляли каждые 3 часа. Компьютерное моделирование влияния света проводилось при использовании неограниченного метода Хартри-Фока, набор базисных функций 3-21G*, температура 400К, шаг моделирования 1 фс, длительность моделирования 5 пс и мультиплетностью молекулы равным 3.

Для изучения влияния действия кислот на стабильность субстанции точную навеску (около 50 мг) помещали в коническую колбу вместимостью 100 мл, добавляли 40 мл спирта этилового 95%, помещали на ультразвуковую ванну на 15 минут до полного растворения субстанции. После чего добавляли 5 мл 1М раствора кислоты хлористоводородной. Полученный раствор кипятили в колбе с обратным холодильником на термостатируемой водяной бане (температура 80°C) в течение 45 минут. По окончании времени, раствор охлаждали и прибавляли 5 мл 1М раствора натрия гидроксида.

Изучение влияния действия щелочей на стабильность субстанции проводили следующим методом: точную навеску (около 50 мг) помещали в коническую колбу вместимостью 100 мл, добавляли 40 мл спирта этилового 95%, помещали на ультразвуковую ванну на 15 минут до полного растворения субстанции. После чего добавляли 5 мл 1М раствора натрия гидроксида. Полученный раствор кипятили в колбе с обратным холодильником на термостатируемой водяной бане (температура 80°C) в течение 45 минут. По окончании времени раствор охлаждали и прибавляли 5 мл 1М раствора кислоты хлористоводородной.

С целью расчетов наиболее вероятных продуктов гидролиза в кислой и щелочной среде был проведен колебательный анализ и расчет термодинамических характеристик с использованием метода теории функционала плотности (UB3LYP) и базисного набора 6-311G** в программе ORCA 4.1. При кислотном ги-

дрозиде продукты реакции были рассчитаны с протонированными третичными азотами. Так как ранее нами был определен титриметрическими методами фактор эквивалентности, равный 0,5, для молекулы VMA-10-21 был произведен расчет Энергий Гиббса одновременно двух протонированных атомов азота молекулы VMA-10-21 во всех возможных комбинациях. При щелочном гидролизе продукты реакции были представлены в виде солей карбоновых кислот –COONa. Энергию Гиббса реакций гидролиза (ΔG_r) рассчитывали по разнице сумм энергий Гиббса продуктов реакции ($\Delta G_{\text{прод}}$) и исходных веществ ($\Delta G_{\text{исх}}$) в соответствии с законом Гесса: $\Delta G_r = \sum \Delta G_{\text{прод}} - \sum \Delta G_{\text{исх}}$

Также были определены термодинамические характеристики воды, ионов OH⁻ и анализируемой субстанции VMA-10-21 без протонирования. Расчет проводился при температуре 310K.

Для изучения влияния действия процесса окисления на стабильность субстанции точную навеску (около 50 мг) помещали в коническую колбу вместимостью 100 мл, добавляли 45 мл спирта этилового 95%, помещали на ультразвуковую ванну на 15 минут до полного растворения субстанции. После чего добавляли 5 мл 3% раствора пероксида водорода. Полученный раствор кипятили в колбе с обратным холодильником на термостатируемой водяной бане (температура 80°C) в течение 45 минут. По окончании времени, раствор охлаждали и проводили анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Химическая стабильность фармацевтических молекул вызывает серьезную обеспокоенность, поскольку она влияет на безопасность и эффективность лекарственного препарата. Руководства FDA и ICH устанавливают требование к данным тестам для определения влияния различных факторов внешней среды на качество фармацевтической субстанции с течением времени. Знание стабильности молекулы помогает в выборе правильного состава и упаковки, а также в обеспечении надлежащих условий хранения и срока годности, что важно для нормативной документации. Искусственная деградация включает в себя деструкцию ЛВ и их полупродуктов в более жестких условиях, чем ускоренные испытания, что позволяет подробно изучить стабильность молекулы и определить наиболее вероятные пути разложения [11].

Информация о стабильности молекул помогают при изготовлении лекарственных форм и определе-

нии условий хранения, поэтому рационально начинать исследования деградации на раннем этапе разработки ЛС [12].

Вопрос о том, насколько степень деградации вещества является достаточной, был темой многих дискуссий среди ученых-фармацевтов. Разложение ЛВ между 5% и 20% было признано обоснованным для хроматографических анализов [13, 14]. Некоторые ученые-фармацевты считают, что 10%-ное разложение является оптимальным для веществ с небольшой молекулярной массой [15]. Нет необходимости, чтобы принудительное разложение приводило к полному разложению вещества. Исследование может быть прекращено, если после воздействия стрессовых условий на фармацевтическую субстанцию или лекарственную форму не наблюдается разложения [16]. Это свидетельствует о стабильности тестируемой молекулы. Чрезмерное действие стресс-тестов на образец может привести к образованию вторичных продуктов разложения, который не будут идентифицированы в исследованиях стабильности при хранении, а недостаточное действие может не дать продуктов разложения [17].

Изучение стабильности VMA-10-21 при воздействии высоких температур (термолиз)

При моделировании молекулярной динамики с целью поиска структуры твердого состояния исследуемого вещества, молекулы субстанции VMA-10-21 располагались упорядоченно, формируя элементы кристаллической решетки (таблица 1).

Эти данные были использованы в качестве начального расположения молекул для дальнейших расчетов методом молекулярной динамики для системы из 4 молекул исследуемого вещества.

В таблице 2 приведено состояние системы в процессе моделирования молекулярной динамики методом Хартри-Фока с базисным набором 3-21G**.

Как видно из таблицы 2, по результатам компьютерного моделирования химическая структура молекулы VMA-10-21 не изменялась, что позволяет предполагать устойчивость молекулы при воздействии повышенной температуры.

Термическое воздействие ICH рекомендует проводить при температурах 60–80°C, т.е. при более высоких температурах, чем при ускоренных испытаниях [18]. Нами была выбрана максимально рекомендуемая температура.

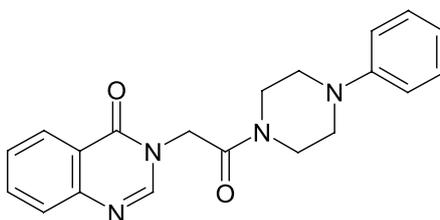


Рисунок 1 – Структурная формула субстанции VMA-10-21

Таблица 1 – Состояние системы в процессе моделирования молекулярной динамики 10 молекул методом молекулярной механики

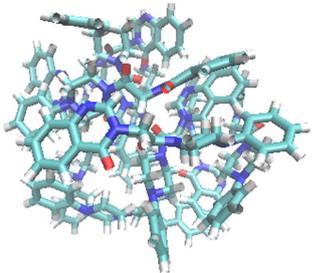
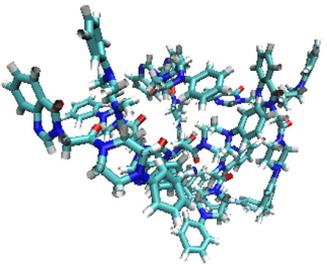
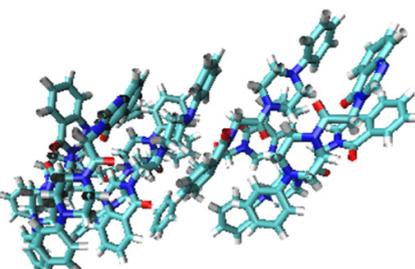
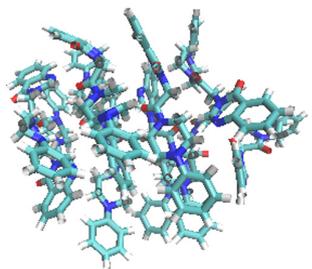
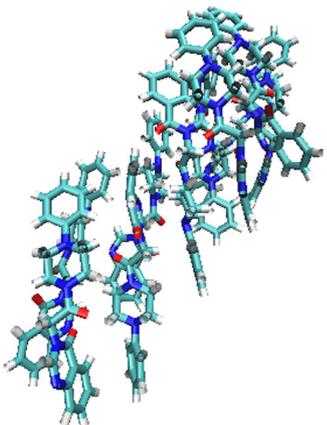
Время, нс	Изображение системы
0	
50	
100	
150	
200	

Таблица 2 – Состояние системы в процессе моделирования молекулярной динамики 0-5000 фс

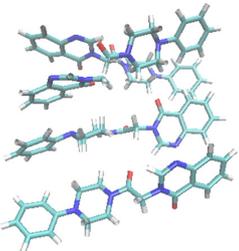
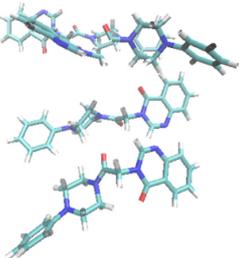
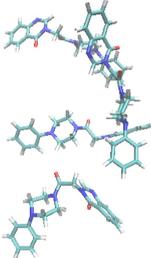
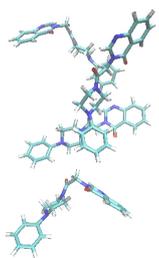
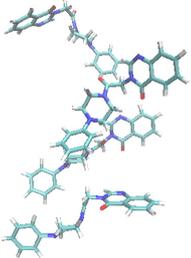
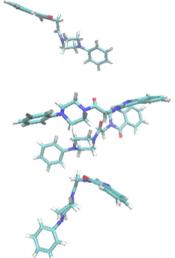
Время, фс	Изображение системы
0	
1000	
2000	
3000	
4000	
5000	

Таблица 3 – Результаты влияния стресс-теста (повышенная температура) на стабильность VMA-10-21

Стресс-тест (нагревание при 80°C)	Содержание VMA-10-21	Процент деградации
VMA-10-21 без нагревания	99,68%	–
VMA-10-21 через 45 минут	99,60%	0,08%
VMA-10-21 через 90 минут	99,58%	0,1%
VMA-10-21 через 135 минут	99,54%	0,14%
VMA-10-21 через 180 минут	99,50%	0,18%

Таблица 4 – Результаты влияния стресс-теста (УФ-свет) на стабильность VMA-10-21

Стресс-тест (УФ-свет 365 нм)	Содержание VMA-10-21	Процент деградации
VMA-10-21 без УФ облучения	99,68%	–
VMA-10-21 через 3 часа	99,66%	–
VMA-10-21 через 6 часов	99,65%	–
VMA-10-21 через 9 часов	99,61%	–
VMA-10-21 через 12 часов	99,60%	–
VMA-10-21 через 15 часов	99,60%	–
VMA-10-21 через 18 часов	99,59%	–
VMA-10-21 через 21 час	99,58%	–
VMA-10-21 через 24 часа	99,56%	–

Таблица 5 – Результаты колебательного анализа всех возможных комбинаций дважды протонированной молекулы VMA-10-21

Молекула	Энтальпия, а.е.	Энтропия, кал/моль*К	Энтальпия, кДж/моль	Энтропия, кДж/моль*К	Энергия Гиббса, кДж/моль
VMA-10-21	–1143,540907	35,914	–3002366,237	0,150364735	–3002366,237
I + III	–1144,153274	35,731	–3003974,007	0,149598551	–3003974,007
I + IV	–1144,189237	35,721	–3004068,428	0,149556683	–3004068,428
II + III	–1144,061293	35,952	–3003300,432	0,150272626	–3003300,432
II + IV	–1144,12641	35,742	–3003732,511	0,150523834	–3003732,511
III + IV	–1144,119529	35,663	–3003903,475	0,149644606	–3003903,475

Таблица 6 – Результаты проведенного колебательного анализа и рассчитанные термодинамические характеристики продуктов гидролиза

Молекула	Энтальпия, а.е.	Энтропия, кал/моль*К	Энтальпия, кДж/моль	Энтропия, кДж/моль*К	Энергия Гиббса, кДж/моль
Продукт №1	–687,469271	106,648	–1805019,32	0,44651	–1805157,74
Продукт №1 (–COONa)	–686,943269	114,886	–1803638,25	0,48100	–1803787,36
Продукт №2	–532,492603	93,828	–1398112,58	0,39284	–1398234,36
Продукт №3	–498,863275	92,872	–1309815,41	0,38884	–1309935,95
Продукт №4	–721,096936	99,055	–1893312,12	0,41472	–1893440,68
Продукт №4 (–COONa)	–720,566026	96,379	–1891918,16	0,40352	–1892043,25
ОН [–]	–75,751778	41,417	–198893,87	0,1734	–198947,62
вода	–76,422293	46,469	–200654,37	0,19456	–200714,68

На рисунке 2 показана хроматограмма спиртового раствора VMA-10-21 перед проведением стресс-тестирования.

На рисунке 3 показана хроматограмма спиртового раствора VMA-10-21 после проведения стресс-тестирования.

Данные по стабильности VMA-10-21 в течение времени 0–180 минут представлены в таблице 3.

Как следует из представленных данных, субстанция VMA-10-21 практически полностью устойчива к воздействию повышенной температуры. Результаты компьютерного моделирования совпали с практическими данными.

Изучение стабильности VMA-10-21 при воздействии УФ-света (фотолиз)

Считается, что фотолитическую деградацию вызывают длины волн в диапазоне 300–800 нм [19]. Исследования фотостабильности являются важным аспектом в исследованиях ЛВ на стабильность, т.к. фотолиз может вызывать фотоокисление по свободно-радикальному механизму, поэтому нами была выбрана наиболее «жесткий» УФ при длине волны 365 нм. На рисунке 4 представлена полученная хроматограмма через 24 часа УФ-воздействия.

Данные по стабильности VMA-10-21 в условиях УФ-воздействия в течение 0–24 часов представлены в таблице 4.

Как следует из представленных данных, субстанция VMA-10-21 устойчива к воздействию УФ-света, что соответствует результатам моделирования.

Изучение стабильности VMA-10-21 под воздействием кислот и оснований (гидролиз)

Гидролиз является одной из наиболее распространенных химических реакций разложения в широком диапазоне pH. Подразумевается, что повышенная влажность, как один из параметров содержания воды в окружающем воздухе, является потенциальной угрозой к осуществлению реакций гидролитического расщепления. При исследовании реакций гидролиза в качестве стресс фактора для первичной деструкции ЛВ рассматривают влияние на нее кислотных и основных условий. Для осуществления кислотного гидролиза используют хлористоводородную либо серную кислоты с концентрациями 0,1–1М, а для щелочного гидролиза – натрия либо калия гидроксиды с концентрациями 0,1–1М [17, 20]. В нашем исследовании мы выбрали кислоту хлористоводородную и натрия гидроксид в максимально допустимых концентрациях 1М.

Для исследуемой субстанции VMA-10-21, теоретически, возможны несколько путей гидролиза, представленные на рисунке 5.

При первом пути гидролиза образуются 2-(4-оксохиназолин-3-ил)уксусная кислота (продукт №1) и

1-фенилпиперазин (продукт №2), а при втором пути 3-метилхиназолин-4-он (продукт №3) и 4-фенилпиперазин-1-карбоновая кислота (продукт №4).

Результаты колебательного анализа по поиску наиболее возможных третичных атомов азота, участвующих в протонировании, представлены в таблице 5.

Протонированный атом азота в положении 1 хиназолинового ядра обозначался I, в 3 положении хиназолинового ядра – II, 1-пиперазино – III, 4-фенил – IV. Как видно из результатов таблицы 5, протонирование атомов азота в молекуле VMA-10-21 наиболее вероятно в положении I и IV. Эта энергия Гиббса и была использована нами при колебательном анализе для VMA-10-21 в реакциях кислотного гидролиза.

В таблице 6 представлены полученные данные колебательного анализа для продуктов гидролиза.

Рассчитанные энергии Гиббса реакций представлены в таблице 7.

Как видно из полученных результатов, гидролиз в щелочной среде для первого пути гидролиза наиболее вероятен, т.к. для этой реакции меньше значение энергии Гиббса. Также видно, что в кислой среде, ввиду большей энергии Гиббса протонированной молекулы I + II, энергия Гиббса гидролиза в кислой реакции увеличилась, поэтому, мы предполагаем, что гидролиз в кислой среде будет протекать менее выражено.

Хроматограмма, полученная в результате взаимодействия раствора VMA-10-21 с кислотой хлористоводородной, представлена на рисунке 6.

Данные по стабильности VMA-10-21 под влиянием кислот представлены в таблице 3.

Как следует из представленных данных, под действием 1М раствора кислоты хлористоводородной происходит частичное разложение молекулы VMA-10-21.

Полученные данные представлены на рисунке 7.

Данные по стабильности VMA-10-21 представлены в таблице 9.

Как следует из представленных данных, под действием 1М раствора натрия гидроксида происходит разложение молекулы VMA-10-21 с процентом деградации 92,61%.

Под действием раствора щелочи происходит разложение молекулы VMA-10-21 с образованием двух превалирующих продуктов с временами удерживания 2,12 мин (около 18%) и 2,98 (около 67%). С помощью ВЭЖХ – МС были установлены структурные фрагменты, образующиеся в результате гидролиза продуктов. На рисунке 8 и 9 представлены полученные масс-спектры.

Пик, со временем удерживания 2,12 мин. соответствует молекулярный ион с молярной массой 162 г/моль, а пик со временем удерживания 2,98 мин. соответствует молекулярный ион с массой 186,9 г/моль. Рассчитанные в результате вычислительного эксперимента наиболее вероятные пути гидролиза подтвердили данные масс-детектора.

Таблица 7 – Рассчитанные энергии Гиббса реакций гидролиза

Путь реакции	Продукт гидролиза	Рассчитанные энергии Гиббса реакции, кДж/моль
Первый	№1 + №2 (кислая среда)	1391,01
	№1 + №2 (щелочная среда)	-707,86
Второй	№3 + №4 (кислая среда)	1406,48
	№3 + №4 (щелочная среда)	-665,343

Таблица 8 – Результаты влияния стресс-теста (гидролиз, кислотный) на стабильность VMA-10-21

Стресс-тест (1М кислота хлористоводородная)	Содержание VMA-10-21	Процент деградации
VMA-10-21 без гидролиза	99,68%	–
VMA-10-21 через 45 минут	98,14%	1,54

Таблица 9 – Результаты влияния стресс-теста (гидролиз, щелочной) на стабильность VMA-10-21

Стресс-тест (1М натрия гидроксид)	Содержание VMA-10-21	Процент деградации
VMA-10-21 без гидролиза	99,68%	–
VMA-10-21 через 45 минут	7,07%	92,61%

Таблица 10 – Результаты влияния стресс-теста (окисление) на стабильность VMA-10-21

Стресс-тест (3% раствор пероксида водорода)	Содержание VMA-10-21	Процент деградации
VMA-10-21 без добавления пероксида водорода	99,68%	–
VMA-10-21 через 45 минут	98,56%	1,12%

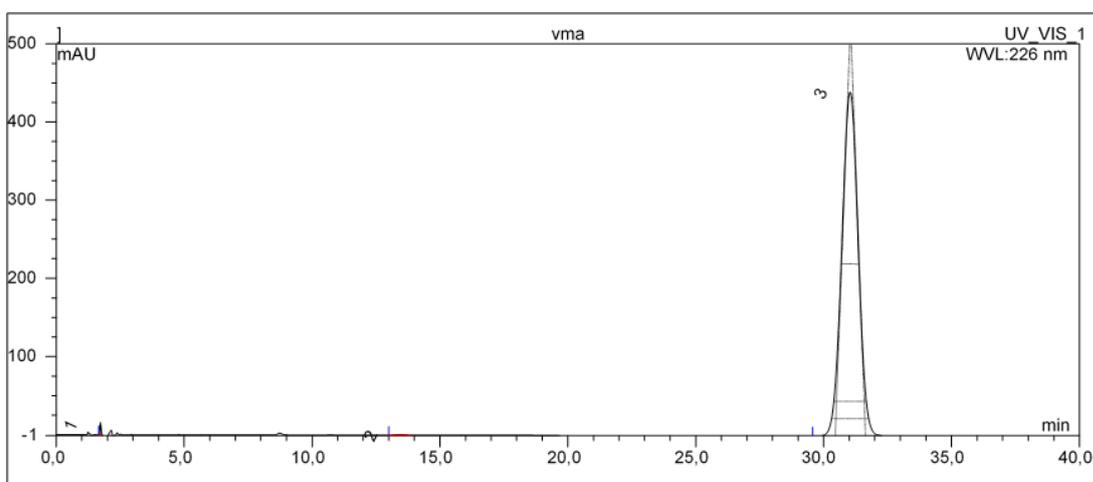


Рисунок 2 – Хроматограмма спиртового раствора VMA-10-21 до начала стресс-тестов

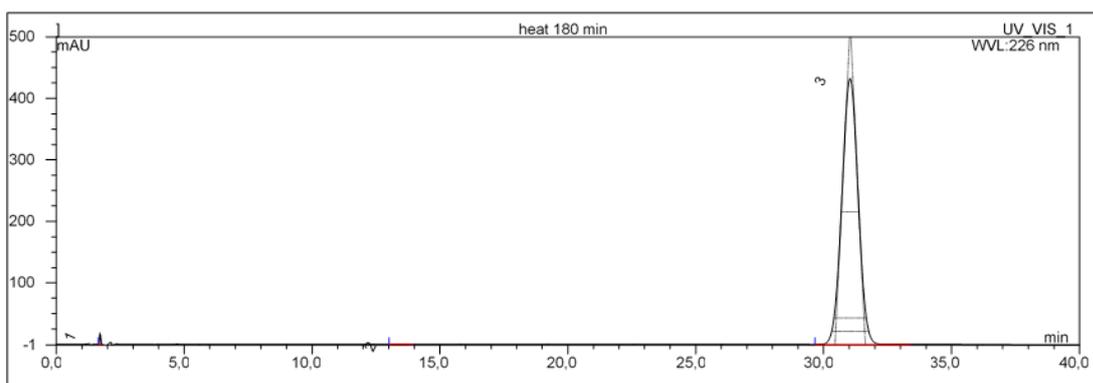


Рисунок 3 – Хроматограмма спиртового раствора VMA-10-21 после нагревания при 80°C 180 минут

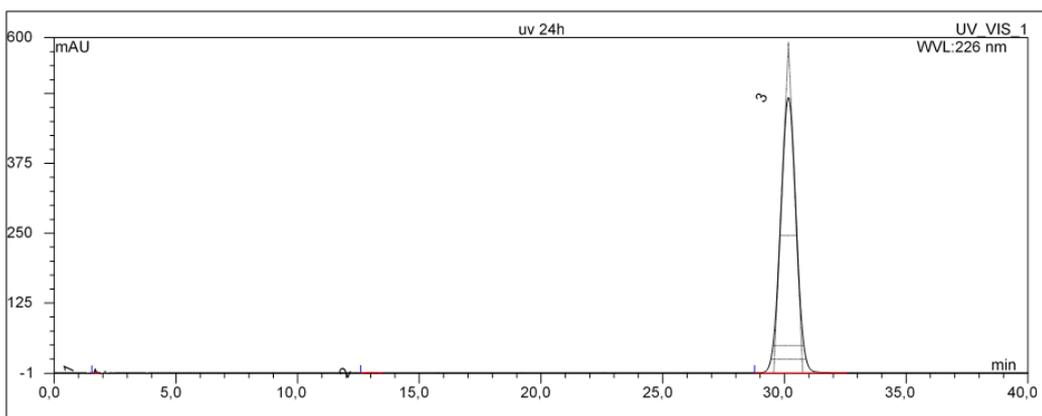


Рисунок 4 – Спиртовой раствор VMA-10-21 под воздействием УФ-света через 24 часа

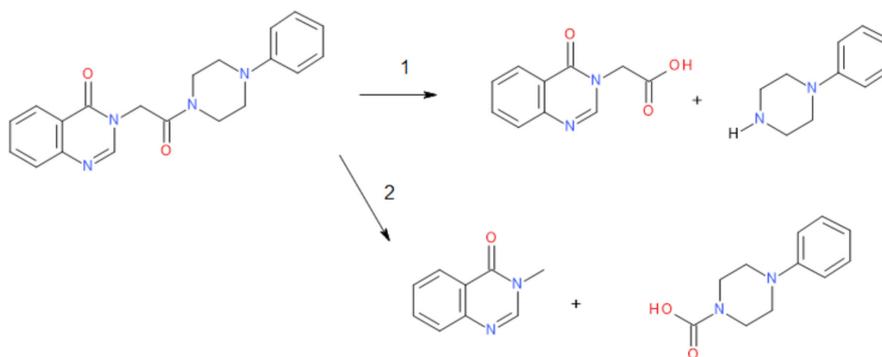


Рисунок 5 – Предполагаемые пути гидролиза субстанции VMA-10-21

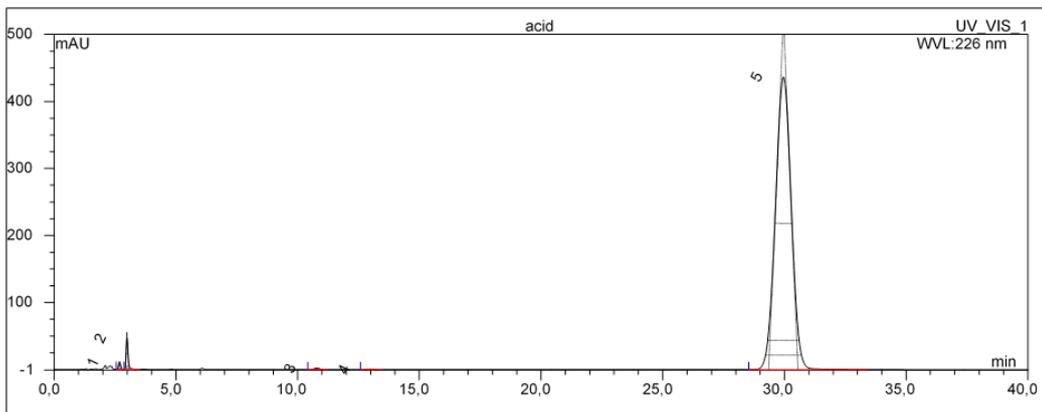


Рисунок 6 – Хроматограмма спиртового раствора VMA-10-21 при гидролизе 1M раствором кислотой хлористоводородной через 45 минут

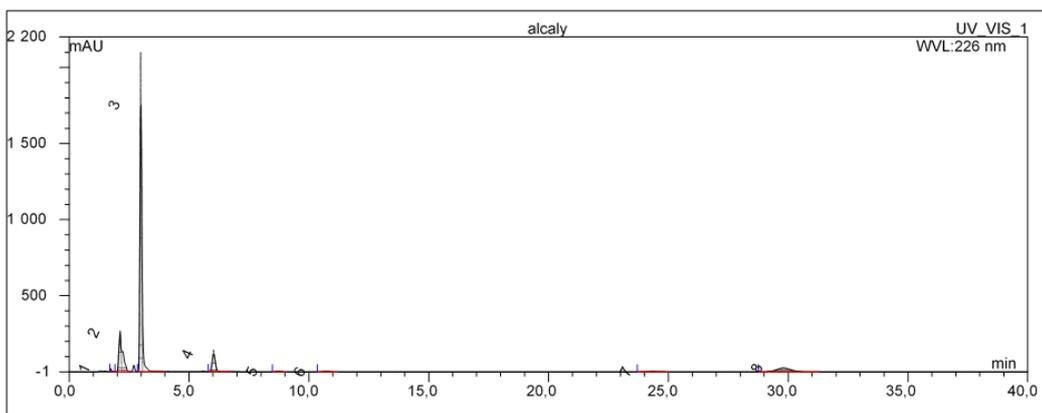


Рисунок 7 – Спиртовой раствор VMA-10-21 при гидролизе 1M раствором натрия гидроксида через 45 минут

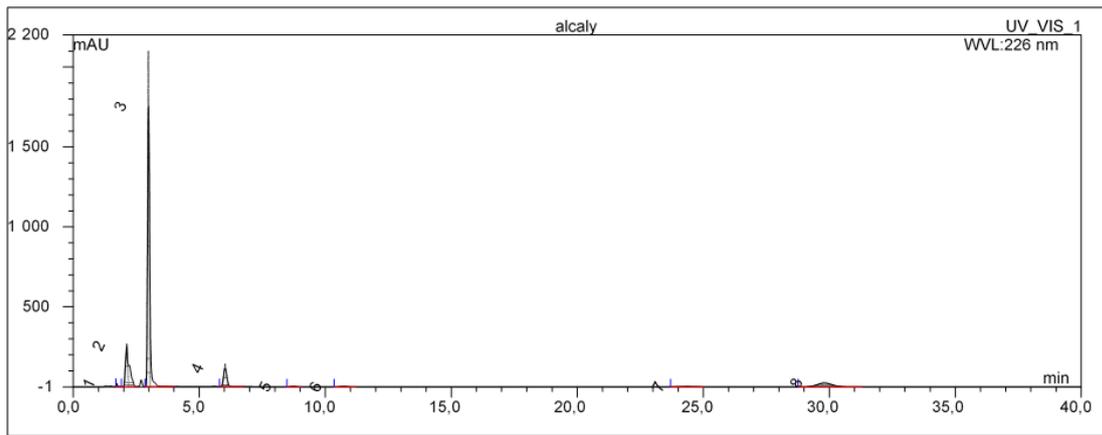


Рисунок 8 – Масс-спектр структурного фрагмента с молекулярной массой 162 г/моль

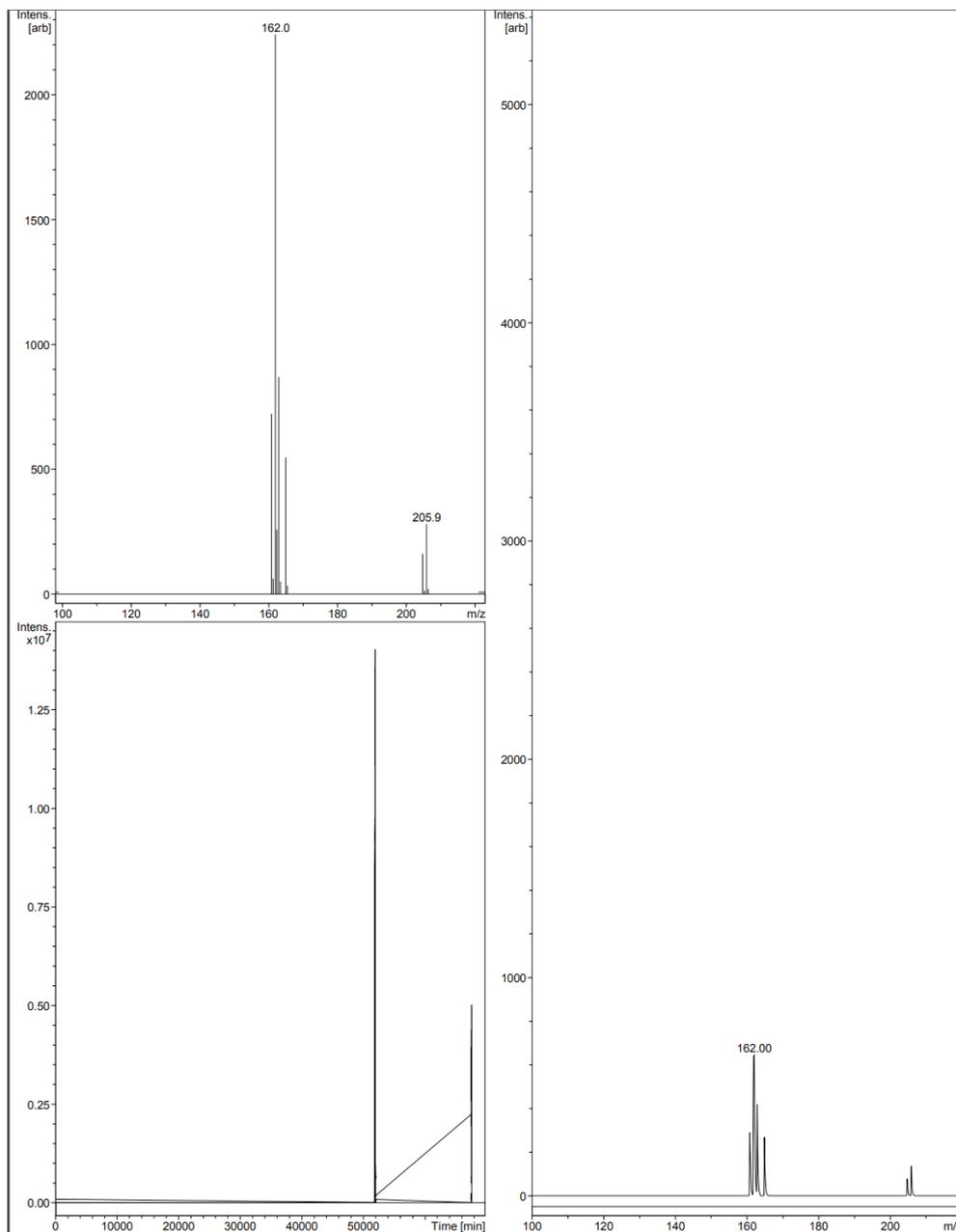


Рисунок 9 – Масс-спектр структурного фрагмента с молекулярной массой 186,9 г/моль

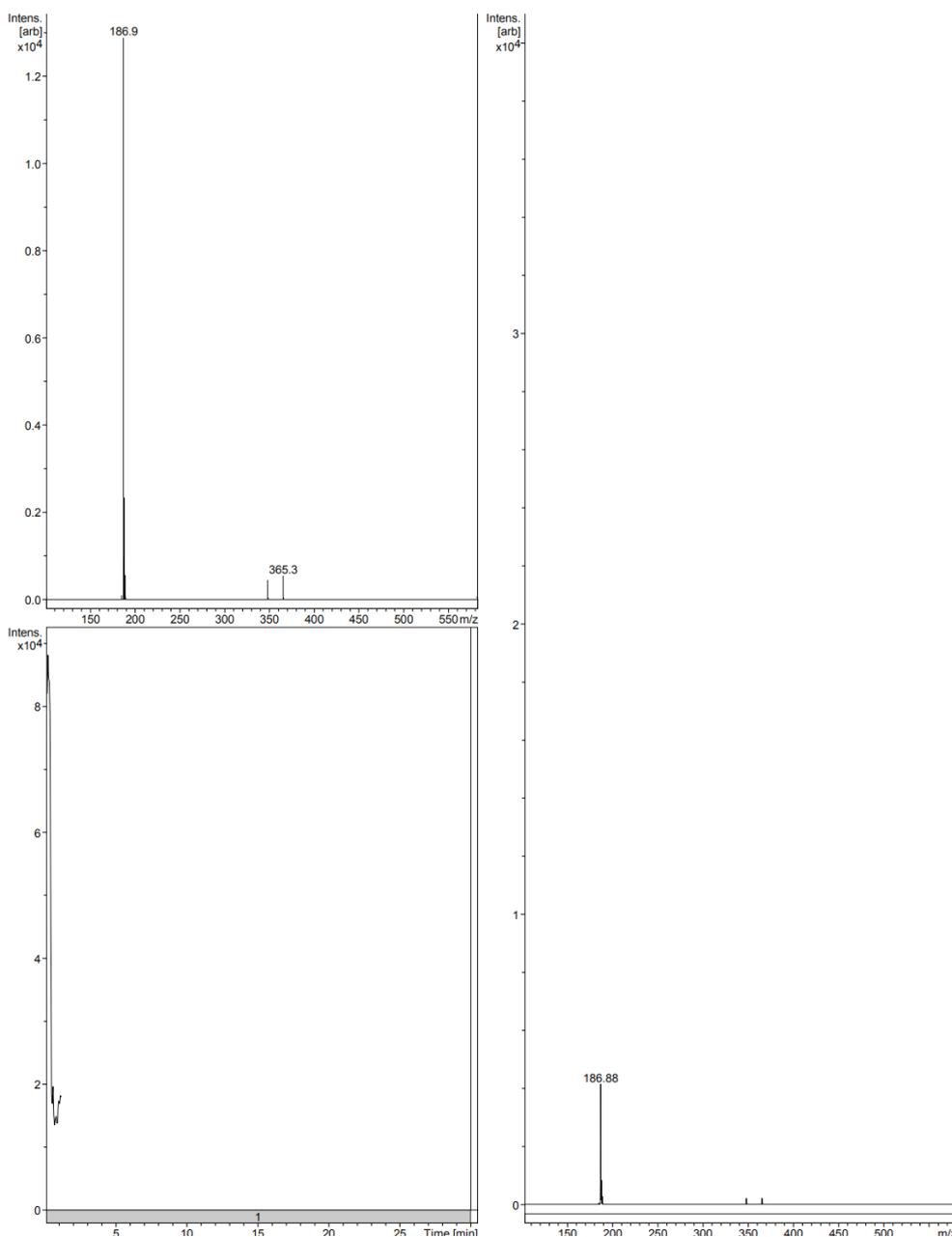


Рисунок 10 – Раствор водорода пероксида 3% без VMA-10-21

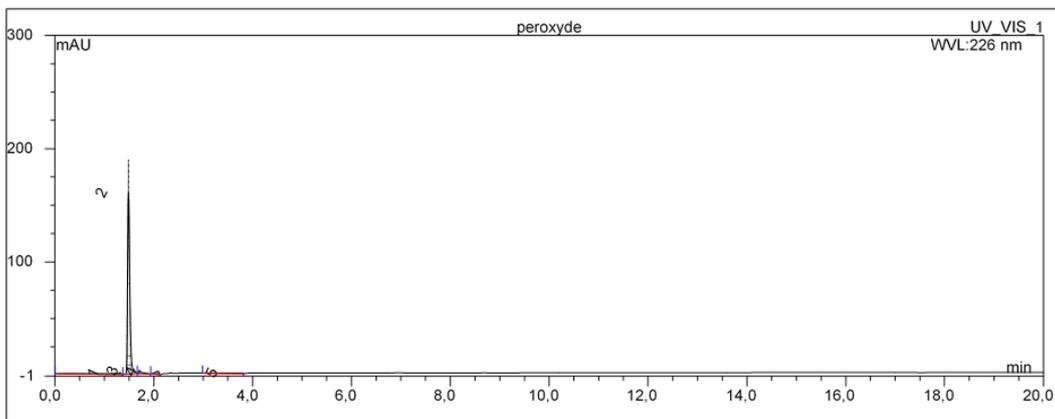


Рисунок 11 – Спиртовой раствор VMA-10-21 с добавлением раствора водорода пероксида 3% через 45 минут

Исходя из полученных данных можно сделать вывод, что разложение молекулы VMA-10-21 происходит по амидной группе (путь 1 на рисунке 5) с образованием двух основных продуктов деструкции, которые разделяются между собой в выбранных хроматографических условиях.

Гидролиз молекулы VMA-10-21 в присутствии 1М раствора кислоты хлористоводородной происходит со значительно меньшим распадом молекулы. Очевидно, это связано со стабилизацией молекулы VMA-10-21 в кислой среде за счет образования солей с кислотой хлористоводородной. Основным продуктом распада в кислой среде является молекулярный ион с массой 186,9 г/моль, который также совпадает по времени удерживания (2,98 мин.)

Изучение стабильности VMA-10-21 под воздействием окислителей.

Для принудительного окисления ЛВ широко используется водорода пероксид, ионы металлов, кислород, инициаторы радикальных реакций (азосоединения, N-нитрозоанилиды, триазены, дибензилы и др). Установлено, что воздействие растворов 0,1–3% водорода пероксида при pH=7 и температуре 20°C в течение семи дней может потенциально привести к появлению соответствующих продуктов деградации [21]. В нашем исследовании применялся максимально допустимый раствор водорода пероксида 3%, но с более коротким временным промежутком.

Сперва был проанализирован раствор водорода пероксида 3% без добавления анализируемой субстанции. Полученная хроматограмма представлена на рисунке 10.

Данные по стабильности VMA-10-21 к воздействию окислителей представлены в таблице 10.

Как следует из представленных данных, под действием раствора водорода пероксида 3% происходит частичное разложение молекулы VMA-10-21, с процентом деградации 1,12%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных стресс-тестов изучена стабильность новой фармацевтической субстанции VMA-10-21. В результате эксперимента установлено, что вещество стабильно при действии высоких температур и УФ-облучения. При проведении гидролиза исследуемая субстанция гидролизуется в щелочной среде по амидной группе с образованием 2 основных продуктов, структурные фрагменты которых установлены с помощью масс-детектора, в кислой среде разложение продукта значительно снижается, что, скорее всего, связано с увеличением стабильности молекулы за счет образования солей с кислотой хлористоводородной и протонированием двух третичных атомов азота. При действии на вещество окислителей (раствор пероксида водорода 3%) происходит незначительная деструкция молекулы (около 1%), что показывает относительную устойчивость молекулы под действием окислителей. Также, представленные компьютерные расчеты позволили предсказать стабильность и наиболее вероятные пути гидролиза исследуемой субстанции, которые соответствуют практическим результатам. Данные результаты будут учитываться в дальнейшем при разработке нормативной документации на субстанцию 3-[2-(4-фенил-1-пиперазин-2-оксоэтил)]хиназолин-4(3H)-он.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Данная работа не имела финансирования от сторонних организаций.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Т.А. Гендугов – компьютерный анализ и обработка полученных результатов, проведение практической части работы; А.А. Глушко – компьютерный анализ и обработка полученных результатов; А.А. Озеров – концепция и стратегия исследования, синтез и очистка субстанции VMA-10-21, редактирование текста; Л.И. Щербаква – концепция и стратегия исследования, редактирование текста.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Государственная Фармакопея Российской Федерации. Изд. XIV. Т. 1. – М., 2018. [Электронный ресурс]. <http://feml.scsml.rssi.ru/feml>
2. ICH guidelines, Q1A (R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products (Revision 2), International Conference on Harmonization; 2003. [Электронный ресурс]. – https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-r2-stability-testing-new-drug-substances-products-step-5_en.pdf
3. ICH Guidance, Q1C: Stability Testing for New Drug Dosage Forms, International Conference on Harmonization. 1996. [Электронный ресурс]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-c-stability-testing-requirements-new-dosage-forms-step-5_en.pdf
4. Existing Active Ingredients and Related Finished Products (CPMP/QWP/122/02 Rev. 1 corr), 2003. [Электронный ресурс]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003466.pdf
5. ICH Guidance, Q1B: Photostability Testing of New Drug Substances and Products, International Conference on Harmonization, 1998. [Электронный ресурс] https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-b-photostability-testing-new-active-substances-medicinal-products-step-5_en.pdf

6. FDA Guidance for Industry, INDs for Phase II and III Studies – Chemistry, Manufacturing and Controls Information, Food and Drug Administration, 2003. [Электронный ресурс]. – <https://www.fda.gov/media/70822/download>
7. Klauda, J.B., Venable, R.M., Freites, J.A., O'Connor, J.W., Tobias, D.J., Mondragon-Ramirez, C., Vorobyov, I., MacKerell, Jr., A.D., Pastor R.W. Update of the CHARMM All-Atom Additive Force Field for Lipids: Validation on Six Lipid Types // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2010. – V. 114, No 23. – P. 7830–7843. DOI: 10.1021/jp101759q
8. Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J.C., Hess B., Lindahl E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers // *SoftwareX*. – 2015. – V. 1–2. – P. 19–25. DOI: 10.1016/j.softx.2015.06.001.
9. Zoete V., Cuendet M. A., Grosdidier A., Michielin O. SwissParam: a Fast Force Field Generation Tool For Small Organic Molecules // *Journal of Computational Chemistry*. – 2011. – V. 32, No 11. – P. 2359–2368. DOI: 10.1002/jcc.21816.
10. Braga C., Travis K. P. A configurational temperature Nosé–Hoover thermostat // *The Journal of Chemical Physics*. – 2005. – V. 123, No 11. – P.123. DOI: 10.1063/1.2013227.
11. Neese F. Software update: The ORCA program system, version 4.0 // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*. – 2017. – Vol. 8, No 1. – P. e1327. DOI: 10.1002/wcms.1327.
12. Bäcktorp C., Örnskov E., Ottosson J., Evertsson E., Remmelgas J., Broo A. Experimental and Quantum Chemical Evaluations of Pyridine Oxidation Under Drug Development Stress Test Conditions // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2015. – V. 104 (12). – P. 4355–4364. DOI: 10.1002/jps.24685
13. Szepesi G., Gazdag M., Mihályfi K. Selection of high-performance liquid chromatographic methods in pharmaceutical analysis // *Journal of Chromatography A*. – 1991. – V. 464. – P. 265–278. DOI:10.1016/s0021-9673(00)94245-6
14. Gazdag M., Szepesi G., Szelezcki E. Selection of high-performance liquid chromatographic methods in pharmaceutical analysis // *Journal of Chromatography A*. – 1988. – V. 454. – P. 83–94. DOI:10.1016/s0021-9673(00)88604-5
15. Carr G.P., Wahlich J.C. A practical approach to method validation in pharmaceutical analysis // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 1990. – V. 8 (8–12). – P. 613–618. DOI:10.1016/0731-7085(90)80090-c
16. Jenke D.R. Chromatographic method validation: a review of common practices and procedures // *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. – 1996. – V. 19 (5). – P. 719–736. DOI: 10.1080/10826079608005533
17. Iram F., Iram H., Iqbal A., Husain A. Forced Degradation Studies // *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*. – 2016. – V. 3, No 6. – P. 73. DOI: 10.15406/japlr.2016.03.00073
18. Blessy M., Patel R.D., Prajapati P.N., Agrawal Y.K. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs – A review // *Journal of Pharmaceutical Analysis*. – 2014. – V. 4, No 3. – P. 159–165. DOI: 10.1016/j.jpfa.2013.09.003
19. Alsante K.M., Ando A., Brown R., et al. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2007. – V. 59, No 1. – P. 29–37. DOI: 10.1016/j.addr.2006.10.006
20. Piechocki J.T., Thoma K. *Pharmaceutical Photostability and Stabilization Technology*, Informa Healthcare. – CRC Press, publ. 2019. – 445p.

АВТОРЫ

Гендугов Тембот Алимович – аспирант кафедры неорганической, физической и коллоидной химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолгГМУ Минздрава России. ORCID: 0000-0002-7447-8328. E-mail: timbirlei2008@rambler.ru

Глушко Александр Алексеевич – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры неорганической, физической и коллоидной химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолгГМУ Минздрава России. ORCID: 0000-0002-1715-0350. E-mail: alexander.glushko@lcmmp.ru

Озеров Александр Александрович – профессор, доктор химических наук, заведующий кафедрой фармацевтической и токсикологической химии Волгоградского государственного медицинского университета Минздрава России. ORCID: 0000-0002-4721-0959. E-mail: prof_ozarov@yahoo.com

Щербак Лариса Ивановна – доцент, кандидат фармацевтических наук, зав. кафедрой неорганической, физической и коллоидной химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолгГМУ Минздрава России. ORCID: 0000-0002-7806-2805. E-mail: shcherbakovali@mail.ru