<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117>
УДК 615.074

Оригинальная статья/Research article

Сравнительный анализ методов определения подлинности субстанции-порошок «Даларгин»

М. Г. Шульженко^{1,2*}, И. А. Василенко¹, Б. И. Уграк³, И. Е. Шохин^{1,5}, Ю. В. Медведев^{4,5},
Е. А. Малашенко⁴

1 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (Российский университет дружбы народов, РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6
2 – ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» (НМИЦ кардиологии) Минздрава России, 121552, Россия, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а
3 – ФГБУ науки «Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского» Российской академии наук, 119991, Россия, г. Москва, Ленинский проспект, д. 47
4 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
5 – ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3

*Контактное лицо: Шульженко Марина Геннадиевна. E-mail: rina.shulzhenko@yandex.ru

ORCID: М. Г. Шульженко – <https://orcid.org/0000-0003-0544-4332>; И. А. Василенко – <https://orcid.org/0000-0002-3135-1917>; Б. И. Уграк – <https://orcid.org/0000-0003-2669-4154>;
И. Е. Шохин – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>; Ю. В. Медведев – <https://orcid.org/0000-0001-6720-4954>; Е. А. Малашенко – <https://orcid.org/0000-0002-4183-7822>.

Статья поступила: 18.05.2020. Статья принята в печать: 30.06.2020. Статья опубликована: 28.08.2020

Резюме

Введение. Контроль качества лекарственного препарата нуждается в систематическом совершенствовании в связи с непрерывным повышением требований к качеству лекарственных средств. При оценке качества субстанций и лекарственных препаратов важнейшими показателями являются подлинность, содержание основного вещества и примесей. Это делает актуальным внедрение в производственную практику современных физико-химических методов анализа при определении таких параметров, как подлинность, содержание основного вещества и примесей. Выбор и применимость того или иного метода возможна только при проведении сравнительных исследований применения того или иного метода для решения данной задачи. Метод желательно должен быть рекомендован фармакопеей, давать однозначные результаты, а выполнение анализов должно быть не дорогим и доступным. Выбранные для сравнительного анализа методы хорошо известны, но необходимо отметить, что в последние годы приборостроительные компании значительно улучшили приборную базу, расширили их возможности. Поэтому одна из задач данной статьи продемонстрировать возможности выбранных методов для решения задач контроля качества лекарственных препаратов на примере даларгина.

Цель. Разработать методы определения подлинности действующего вещества в субстанции-порошок «Даларгин» с использованием ЯМР-спектроскопии, ИК-спектроскопии, масс-спектрометрии. Провести сравнительный анализ применимости выбранных методов для решения поставленной задачи.

Материалы и методы. Для определения подлинности в субстанции-порошок «Даларгин» использовали методы масс-спектрометрии, ¹³C-ЯМР- и ¹H-ЯМР-спектроскопии, ИК-спектроскопии.

Результаты и обсуждение. Разработаны методы определения подлинности исследуемого вещества методами ЯМР-, ИК- и масс-спектрометрии. Проведено сравнительное изучение возможностей выбранных методов при решении поставленной задачи. Были сделаны выводы о применимости метода ЯМР не только при определении подлинности даларгина, но и при решении задачи определения содержания основного вещества и примесей.

Заключение. Разработаны методы подлинности в субстанции-порошок «Даларгин» методами масс-, ИК- и ЯМР-спектроскопии. Установлено, что более информативным методом для установления подлинности является ¹H-ЯМР-спектроскопия.

Ключевые слова: даларгин, лейцинэнкефалин, определение подлинности, масс-спектрометрия, ЯМР-спектроскопия, ИК-спектроскопия.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. М. Г. Шульженко, И. А. Василенко отработали методики определения подлинности субстанции-порошок «Даларгин». М. Г. Шульженко, Б. И. Уграк, И. Е. Шохин, Ю. В. Медведев сняли ЯМР-спектры, масс-спектры и ИК-спектры субстанции-порошок «Даларгин». М. Г. Шульженко, И. А. Василенко проводили интерпретацию результатов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Шульженко М. Г., Василенко И. А., Уграк Б. И., Шохин И. Е., Медведев Ю. В., Малашенко Е. А. Сравнительный анализ методов определения подлинности субстанции-порошок «Даларгин». *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):111–117. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117>

Comparative Analysis of Dalargin Pharmaceutical Substance Identification Methods

Marina G. Shulzhenko^{1,2*}, Ivan A. Vasilenko¹, Bagdan I. Ugrak³, Igor E. Shohin^{1,5}, Yuri V. Medvedev^{4,5},
Evgeniya A. Malashenko⁴

1 – Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia
2 – Experimental production of biomedical preparations «Of the Federal State Budgetary institution» «National Medical Research Center of Cardiology» of the Ministry of Health of Russia, 15a, 3rd Cherepkovskaya str., Moscow, 121552, Russia
3 – N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry Russian Academy of Sciences, 47, Leninsky Prospekt, Moscow, 119991, Russia
4 – I. M. Sechenov First MSU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia
5 – LLC «CPHA», 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

*Corresponding author: Marina G. Shulzhenko. E-mail: rina.shulzhenko@yandex.ru

ORCID: Marina G. Shulzhenko – <https://orcid.org/0000-0003-0544-4332>; Ivan A. Vasilenko – <https://orcid.org/0000-0002-3135-1917>; Bagdan I. Ugrak – <https://orcid.org/0000-0003-2669-4154>;
Igor E. Shohin – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>; Yuri V. Medvedev – <https://orcid.org/0000-0001-6720-4954>; Evgeniya A. Malashenko – <https://orcid.org/0000-0002-4183-7822>.

Received: 18.05.2020. Revised: 30.06.2020. Published: 28.08.2020

© Шульженко М. Г., Василенко И. А., Уграк Б. И., Шохин И. Е., Медведев Ю. В., Малашенко Е. А., 2020

© Shulzhenko M. G., Vasilenko I. A., Ugrak B. I., Shohin I. E., Medvedev Yu. V., Malashenko E. A., 2020

Abstract

Introduction. The quality control of a medicinal product needs to be systematically improved in connection with a continuous increase in the requirements for the quality of medicines. When assessing the quality of substances and drugs, the most important indicators are authenticity, the content of the main substance and impurities. This makes it relevant to introduce modern physical and chemical methods of analysis into industrial practice in determining parameters such as authenticity, the content of the main substance and impurities. The choice and applicability of a particular method is possible only when conducting comparative studies on the application of a particular method to solve this problem. The method should preferably be recommended by the Pharmacopoeia, give unambiguous results, and the analysis should not be expensive and affordable. The methods chosen for comparative analysis are well known, but it should be noted that in recent years, instrument-making companies have significantly improved their instrument base and expanded their capabilities. Therefore, one of the objectives of this article is to demonstrate the capabilities of the selected methods for solving the problems of drug quality control using dalargin as an example.

Aim. To develop methods for determining the authenticity of the active substance in a substance – Dalargin powder using NMR spectroscopy, IR spectrometry, and Mass spectrometry. Conduct a comparative analysis of the applicability of the selected methods to solve the problem.

Materials and methods. To determine the authenticity of the substance – the powder «Dalargin» used the methods of mass spectrometry, ^{13}C NMR and ^1H NMR spectrometry and IR spectrometry.

Results and discussions. Methods have been developed for determining the authenticity of the test substance by NMR, IR, and mass spectrometry. A comparative study of the possibilities of the selected methods in solving the problem. Conclusions were drawn about the applicability of the NMR method not only in determining the authenticity of dalargin, but also in solving the problem of determining the content of the main substance and impurities.

Conclusion. Authenticity methods have been developed in the substance – Dalargin powder by Mass, IR, and NMR spectrometry. It has been established that ^1H NMR spectrometry is a more informative method for authenticating.

Keywords: dalargin, leucine enkephalin, determination of authenticity, Mass spectrometry, NMR spectrometry, IR spectrometry.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Marina G. Shulzhenko, Ivan A. Vasilenko worked out methods for determining the authenticity of a substance – Dalargin powder. Marina G. Shulzhenko, Bagdan I. Ugrak, Igor E. Shohin, Yuri V. Medvedev took the NMR spectra, Mass spectra and IR spectra of the substance – Dalargin powder. Marina G. Shulzhenko, Ivan A. Vasilenko interpreted the results. All authors participated in the discussion of the results and the writing of the text of the article.

For citation: Shulzhenko M. G., Vasilenko I. A., Ugrak B. I., Shohin I. E., Medvedev Yu. V., Malashenko E. A. Comparative analysis of methods for determining the authenticity of the substance – «Dalargin» inquiry. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):111–117. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-111-117>

ВВЕДЕНИЕ

Способы фармацевтического анализа нуждаются в систематическом совершенствовании в связи с непрерывным повышением требований к качеству лекарственных средств, причем растут требования как к степени чистоты лекарственных веществ, так и к количественному содержанию. Поэтому необходимо широкое использование не только химических, но и более чувствительных физико-химических методов для оценки качества лекарств. Прямые методы определения подлинности субстанции это методы ЯМР, ИК-спектроскопии, масс-спектрометрии. Наиболее часто встречающийся метод определения подлинности в действующих нормативных документах – это хроматография, при всех достоинствах данного метода это косвенный метод определения подлинности. Предлагаемые методы являются рекомендованными к использованию национальными фармакопеями, включая Российскую фармакопею. Немаловажным вопросом при использовании выбранного метода является его доступность и возможность оснащения лаборатории. Необходимо отметить, что выбранные методы доступны и могут быть использованы при контроле качества продукции, как каждодневные рутинные анализы.

Объектом исследования была субстанция-порошок «Даларгин». Субстанция «Даларгин» производства ООО «Бион» используется для производства лио-

филированного препарата «Даларгин» на заводе ЭПМБП ФГБУ «НМИЦ Кардиологии» Минздрава России.

Химическое название: тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина ацетат.

Молекулярная масса: 725,835.

Молекулярная формула: $\text{C}_{35}\text{H}_{51}\text{N}_9\text{O}_8$.

Структурная формула:

Даларгин – это противоязвенный препарат, синтетический гексапептид, аналог лейцинэнкефалина. Проявляет выраженное цитопротекторное и регенеративное действие и может занимать важное место при лечении заболеваний внутренних органов. Молекула даларгина довольно сложная с одной стороны, но с другой стороны на примере даларгина наиболее ярко можно продемонстрировать достоинства выбранных методов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Определение подлинности с использованием масс-спектрометрии:

1,0 мг субстанции даларгина растворяли в 1 мл воды класса 1, количественно переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили водой класса 1 до метки, перемешивали.

Ввод пробы и детектирование проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1260 Infinity с масс-селективным детектором G6125B. Обработку первичных данных проводили при помощи программного обеспечения OpenLab CDS ChemStation Edition (Rev.C.01.07SR3), Agilent Technologies, США.

Подвижная фаза:

Элюент А: 0,1 % раствор (по объёму) муравьиной кислоты в воде класса 1.

Элюент В: ацетонитрил.

Объем вводимой пробы: 20 мкл.

Параметры источника ионизации (электроспрей): распыляющий газ 414 кПа, осушающий газ 12,0 л/мин, линия десольватации 300 °С, напряжение на капилляре 1500 В и –1500 В.

Режим ионизации: положительный/отрицательный (50/50 по времени).

Условия детектирования испытуемого образца: сканирование в диапазоне 200–900 m/z.

Определение подлинности с использованием ЯМР-спектроскопии:

К 300 мг субстанции даларгина добавляют 600 мл воды тяжелой-D2 (D_2O) – химическая чистота $\geq 99,9$ %, изотопная чистота используемой воды 99,8 % (производитель SOLVEX-D). Полученный раствор переносят в ампулу используемую для ЯМР.

Съемка ЯМР-спектров проводилась на импульсном ЯМР-спектрометре Bruker Avance с рабочей частотой на ядрах 1H – 500 МГц; температура – 300 К (27 °С).

Длительность сбора данных для регистрации спектра не менее 2 с.

Длительность повтора съемки не менее 3 с; Число накоплений спада свободной индукции 32 скана.

Определение подлинности с использованием ИК – спектроскопии:

1–3 мг даларгина, предназначенного для испытания, растирают с 150–200 мг KBr тщательно измельченного в агатовой ступке, высушенного при 105 °С в вакууме, в течение 12 ч калия бромида. Смесь тщательно перетирают, добиваясь необходимой однородности, и прессуют образующуюся таблетку при давлении около 800 МПа в вакууме (2–3 мм рт. ст.) в течение 2–5 минут. При визуальном осмотре на образующемся диске не должно быть неоднородностей и трещин. Затем помещают диск с испытуемым веществом в специальную кювету и проводят съемку образца.

Съемку спектра проводили на инфракрасном спектрометре Shimadzu FTIR-8400S в рабочей облас-

ти спектра от 4000 до 400 cm^{-1} при спектральном разрешении 1,0 cm^{-1} в режиме пропускания, количество сканов 20.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В масс-спектрах испытуемого образца даларгина (рисунки 1 и 2) проявляется пик молекулярного иона 724,4 в отрицательном режиме ионизации и пики молекулярного иона 726,2 ($z = 1$), пик 363,8 ($z = 2$) в положительном режиме ионизации, которые соответствуют расчетной брутто формуле даларгина ($C_{35}H_{51}N_9O_8$). Пик M^{+1} 727 обусловлен вкладом природного изотопа ^{13}C , присутствующего в молекуле даларгина. По данным масс-спектрометрии можно однозначно определить брутто формулу молекулы даларгина. Это является принципиальным при доказательстве подлинности препарата «Даларгин». По соотношению пиков M^+ и M^{+1} можно определить количество атомов углерода в молекуле даларгина. Расчетное количество атомов углерода – $(35 \cdot 1.1)$ 38,5 %, измеренное по соотношению M^+ и M^{+1} – 43,7 %.

В спектре 1H -ЯМР (рисунок 3) сигналы при 0,8–1,2 м.д. соответствуют сигналам протонов метильных групп даларгина. Сигнал при 1,8 м.д. соответствует сигналу метильной группы остатка уксусной кислоты. В области 2,5–4,5 м.д. проявляются сигналы CH_2 групп даларгина. В области 6,6–8,6 м.д. проявляются сигналы ароматических остатков молекулы даларгина. Уширенные сигналы в области 5–6 м.д. и 7,5–7,8 м.д. соответствуют сигналам протонов аминокислотных групп. Протонный спектр дает информацию о структуре и количественном содержании остатка уксусной кислоты. Сигнал остатка уксусной кислоты (1,8 м.д.) по интегральной интенсивности совпадает с декларируемым содержанием уксусной кислоты 10,6 %. Интегральная интенсивность всех сигналов в спектре 1H -ЯМР соответствует количеству протонов в данной группировке.

В спектрах ^{13}C -ЯМР (рисунок 4) подтверждается структура молекулы даларгина. Поскольку молекула даларгина ассиметричная, количество сигналов и количество атомов углерода не совпадают, а в области 40 ppm идет наложение большого количества сигналов. Поскольку в спектре ^{13}C используется широкополосная развязка от протонов, то интегральная интенсивность сигналов не может быть использована для определения количества ядер ^{13}C при данном химическом окружении. Данные спектроскопии 1H и ^{13}C -ЯМР позволяют сделать вывод о том, что ЯМР на ядрах протонов более нагляден при доказательстве подлинности субстанции даларгина, чем ЯМР на ядрах углерода. Т. е. метод 1H -ЯМР является предпочтительным методом при доказательстве подлинности субстанции даларгина.

Рисунок 1. Масс-спектр испытуемого образца даларгина, отрицательный режим ионизации

Figure 1. Mass spectrum of the dalargin test sample, negative ionization mode

В ИК-спектре испытуемого образца даларгина (рисунок 5) подтверждается структура молекулы даларгина, но поскольку молекула сложная, то достоверно можно определить наличие гидроксильных групп по полосе поглощения 3400 см^{-1} ; аминных групп по полосе поглощения 3200 см^{-1} ; алкильных групп, полоса поглощения 2900 см^{-1} и карбонильных функциональных групп, полоса поглощения 1740 см^{-1} . Другие сигналы идентифицировать и однозначно отнести к определенным функциональным группам не представляется возможным из-за сложности молекулы. Поэтому ИК-спектроскопия для данной молекулы может быть использована как дополнительная наряду с ^1H -ЯМР-спектроскопией.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработаны методы определения подлинности даларгина методами ИК-, ЯМР- и масс-спектрометрии. При сравнительном анализе используемых методов был сделан вывод о том, что наиболее перспективным методом анализа подлинности даларгина является ЯМР-спектроскопия на протонах.

Было предложено использовать ^1H -ЯМР как для входного контроля качества субстанций, так и при выходном контроле качества готовой лекарственной формы, а так же для анализа содержания уксусной кислоты. ИК-спектроскопия для даларгина может быть использована как дополнительный метод наряду с ^1H -ЯМР.

Продемонстрированы возможности методов ЯМР-, ИК-спектроскопии, масс-спектрометрии в контроле качества субстанции даларгин по показателям подлинность, содержание основного вещества и примесей. Был сделан вывод о том, что разработанные методы могут быть использованы в контроле качества и включены в проект обновленного НД на субстанцию-порошок «Даларгин».

ЛИТЕРАТУРА

1. Лебедев А. Т. Масс-спектрометрия в органической химии. М.: БИНОМ, 2003. 493 с.
2. Моррисон Р., Бойд Р. Органическая химия. М.: Мир, 1974. 1133 с.
3. Малышев Ю. П., Чуприн С. В., Долмова К. А. Использование даларгина в анестезиологии. *Вестник интенсивной терапии*. 2012;55:91–93.
4. Silverstein R. M., Webster F. X., Kiemle D. J. Spectrometric identification of organic compounds. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2005. 502 p.
5. Беккер Ю. Спектроскопия. М.: Техносфера, 2009. 528 с.

REFERENCES

1. Lebedev A.T. Mass spectrometry in organic chemistry. Moscow, BINOM, 2003. 493 p. (In Russ.).
2. Morrison R., Boyd R. Organic Chemistry. Moscow, Mir, 1974. 1133 p. (In Russ.).
3. Malyshev Yu. P., Chuprin S. V., Dolmova K. A. The use of dalargin in anesthesiology and intensive care. *Vestnik intensivnoj terapii = Annals of critical care*. 2012;55:91–93. (In Russ.).
4. Silverstein R. M., Webster F. X., Kiemle D. J. Spectrometric identification of organic compounds. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2005. 502 p.
5. Becker Yu. Spectroscopy. Moscow, Tekhnosfera = Technosphaera, 2009. 528 p. (In Russ.).

Рисунок 3. Спектр ^1H -ЯМР 500.13 мГц испытуемого образца даларгина в DCCL_3

Figure 3. ^1H NMR spectrum of 500.13 MHz of the dalargin test sample in DCCL3

Рисунок 4. Спектр ^{13}C -ЯМР 125.6 мГц испытуемого образца даларгина в CDCl_3

Figure 4. ^{13}C NMR spectrum of 125.6 MHz of the test sample of dalargin in CDCl_3

Рисунок 5. ИК-спектр испытуемого образца даларгина в KBr

Figure 5. IR spectrum of the dalargin test sample in KBr