



Индикация и идентификация опасных веществ

УДК 543.544.5.068.7

DOI: 10.25514/CHS.2021.1.19009

Применение метода ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения для идентификации и количественного определения примесей в субстанции препарата «Ломустин»

И. О. Решетникова¹✉, С. В. Метлицких^{1,2}, Н. Д. Стекленева¹, А. Н. Волов¹

¹Федеральное государственное унитарное предприятие Центральный научно-исследовательский институт химии и механики им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия, e-mail: gu_irina1989@mail.ru

²Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

Поступила в редакцию: 30.03.2021 г., после доработки: 16.04.2021 г., принята в печать: 20.04.2021 г.

Аннотация – Предложен метод высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения) для исследования растворов стандартов субстанции препарата «Ломустин», входящего в перечень «Жизненно необходимые и важнейшие лекарственные препараты», и специфических примесей, определение которых регламентируется Европейской фармакопеей. В результате исследований выявлена новая специфическая примесь, качественное и количественное содержание которой не регламентируется Европейской фармакопеей.

Ключевые слова: ломустин, 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-нитрозомочевина, специфические примеси, 1,3-бис(2-хлорэтил)мочевина, 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексилмочевина, 1,3-дициклогексилмочевина, ВЭЖХ-МС/МС, тандемная масс-спектрометрия

Indication and identification of hazardous substances

UDC 543.544.5.068.7

DOI: 10.25514/CHS.2021.1.19009

Application of the HPLC-QTOF method for the identification and quantitative determination of impurities in the substance of the drug «Lomustine»

Irina O. Reshetnikova¹✉, Sergey V. Metlitsckih^{1,2}, Nadezhda D. Stekleneva¹, Alexander N. Volov¹

¹D.I. Mendeleev Central Research Institute of Chemistry and Mechanic, Moscow, Russia, e-mail: gu_irina1989@mail.ru

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Received: March 30, 2021; Revised: April 16, 2021; Accepted: April 20, 2021

Abstract – A highly efficient liquid chromatography–quadrupole-time of flight mass spectrometry (HPLC-QTOF-MS) method was proposed for the study of solutions of the substance standards of the drug Lomustin, which is included in the List of Vital Drugs, as well as specific impurities regulated by the European Pharmacopoeia. As a result of the study, a new specific impurity was found.

Keywords: lomustine, 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea, specific impurities, 1,3-bis(2-chloroethyl)urea, 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexylurea, 1,3-dicyclohexylurea, HPLC-MS/MS tandem mass-spectrometry.

ВЕДЕНИЕ

Благодаря государственной программе РФ «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности» (Фарма-2020), продленной до 2024 года, существенно возрос интерес к возможности организации производства и контроля качества импортируемых лекарственных субстанций непосредственно на территории Российской Федерации. Особую важность, при этом, представляют лекарственные препараты, входящие в перечни «Жизненно необходимые и важнейшие лекарственные препараты» (ЖВНЛП) и «Обеспечение необходимыми лекарственными средствами» (ОНЛС) [1]. Одним из часто применяемых в химиотерапии злокачественных опухолей лекарственных препаратов является препарат «Ломустин», включающий, в качестве действующего вещества, 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-нитрозомочевину [1–3], современный метод синтеза которой заключается в обработке этаноламина циклогексилизоцианатом с последующим хлорированием образующейся 1-циклогексил-3-(2-гидроксиэтил)мочевина хлористым тионилем и дальнейшим нитрозированием получившейся 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексилмочевина с участием системы $\text{HCOOH} / \text{NaNO}_2$ [4] (рис. 1).

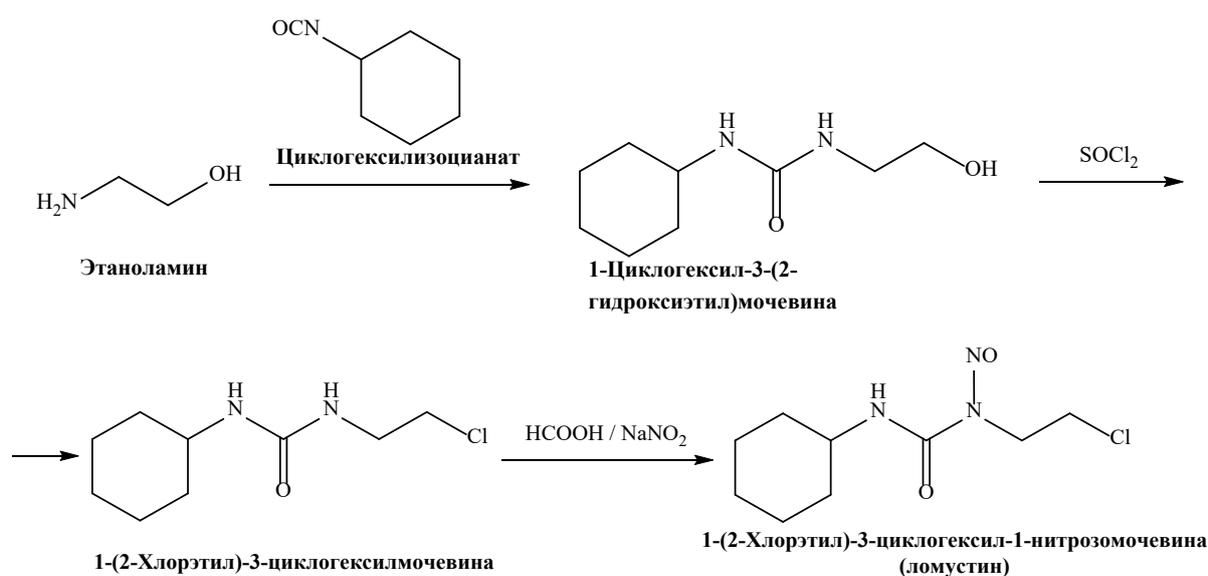


Рис. 1. Современный способ синтеза 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-нитрозомочевины.

Fig. 1. Modern method for the synthesis of 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea.

Согласно Европейской фармакопее 7-ого издания подлинность препарата «Ломустин» устанавливается на основе данных ИК-спектроскопии, а в качестве вспомогательных методов применяется спектрофотометрия в УФ-области спектра и качественная реакция на определение хлоридов. Допустимое содержание примесей нормируется методами ВЭЖХ и ТСХ. Основные вещества, определение которых, согласно Европейской фармакопее, является обязательным, относятся к специфическим примесям А (1,3-бис(2-хлорэтил)мочевина), В (1-(2-хлорэтил)-3-циклогексилмочевина) и С (1,3-дициклогексилмочевина) [5], структура которых представлена на рисунке 2.

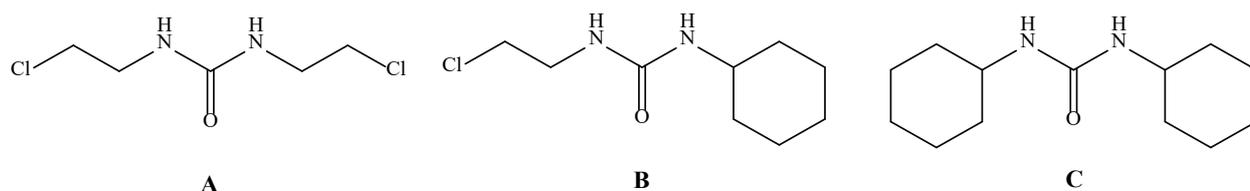


Рис. 2. Специфические примеси в составе препарата «Ломустин».

Fig. 2. Specific impurities in Lomustine.

Недостатком перечисленных методов является довольно низкая специфичность ИК-спектроскопии в присутствии дополнительных структурно схожих с действующим веществом контаминантных компонентов в пробе и недостаточная точность и чувствительность метода тонкослойной хроматографии для определения специфических примесей, содержащихся в субстанции в малых количествах [6]. В связи с этим, для контроля качества при производстве, хранении и транспортировке субстанции препарата «Ломустин» целесообразно использование метода ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения как современного и более совершенного метода анализа [7]. Целью данного исследования является разработка метода идентификации и количественного определения специфических примесей А, В и С, а также идентификация возможных продуктов деградации субстанции с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с квадруполь-времяпролетным масс-спектрометрическим детектированием (HPLC-QTOF).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование

Хроматографическое разделение осуществляли с использованием системы ВЭЖХ-МС/МС с диодно-матричным (Agilent Technologies, США) и тандемным масс-селективным детектором Q-TOF Maxis Impact (Bruker Daltonics, Германия) с источником ионизации электроспрей (ESI). Данные обрабатывались с использованием программного обеспечения Compass HyStar (Version 3.2 Build 49.9).

Для приготовления растворов применяли ультразвуковую ванну Branson (Emerson, США), аналитические весы Sartorius TE64 (Sartorius AG, Германия), дозаторы переменного объема 20–200 мкл и 100–1000 мкл (Sartorius AG,

Германия), мерные пипетки 1, 2 и 5 мл (HIRSCHMANN, Carl Roth GmbH, Германия).

Реактивы и растворы

В работе были использованы стандарт субстанции 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-нитрозомочевины (98%, «abcg» GmbH, Германия); ацетонитрил (for LC-MS, Panreac, Испания); муравьиная кислота (for LC-MS, Merck, США); вода Milli-Q, герметизирующая лабораторная пленка Parafilm (Pechiney, США), стандарты специфических примесей А (USP, CAS 2214-72-4, Merck, Германия), В (USP, CAS 13908-11-7, Merck, Германия), С (USP, CAS 2387-23-7, Merck, Германия).

Анализируемый раствор стандарта субстанции 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-нитрозомочевины с концентрацией 1 мг/мл готовили путем растворения навески $5 \pm 0,2$ мг в ацетонитриле, помещали на хранение в холодильник при температуре плюс 4°C на 7 суток в герметично закрытой стеклянной виае и сравнивали со свежеприготовленным раствором стандарта субстанции 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-нитрозомочевины в ацетонитриле. Для количественной оценки примесей в анализируемом и свежеприготовленном растворах стандарта субстанции готовили растворы стандартов специфических примесей А, В, и С в ацетонитриле с концентрациями: А – $1 \cdot 10^{-2}$ мг/мл, В – $5 \cdot 10^{-3}$ мг/мл, С – $5 \cdot 10^{-4}$, мг/мл. При анализе каждой серии образцов использовали только свежеприготовленные растворы стандартов специфических примесей.

Условия хроматографирования

Количественное определение проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1260, оснащенным градиентным насосом, термостатом колонок, дегазатором, автосамплером, диодно-матричным и тандемным квадруполь-времяпролетным масс-спектрометрическим детектором. Обработку данных осуществляли при помощи программного обеспечения Compass NuStar (Version 3.2 Build 49.9), Bruker Daltonics, Германия.

Подвижная фаза: 0,1% муравьиная кислота/вода (линия А): 0,1% муравьиная кислота/ацетонитрил (линия В). Градиент состава подвижной фазы: 0–13 мин – от 80% до 99% В; 13–18 мин – 80% В. Колонка: Synergi Polar-RP, 4,6x150 мм, 4 мкм, 80 Å при температуре 35°C. Скорость потока подвижной фазы – 0,4 мл/мин, объем вводимой пробы – 2 мкл, время анализа – 18 мин.

Условия детектирования

В таблице 1 представлены параметры масс-спектрометрического детектирования.

Таблица 1. Параметры масс-спектрометрического детектирования
Table 1. Mass spectrometric detection parameters

Режим сканирования	Источник	Настройки детектора
Сохранять линейные спектры и спектры профиля Расчет линейных спектров: использовать максимальную интенсивность Абсолютный порог (на 1000 сумм.): 1 cts; Абсолютный порог: 5 cts; Ширина суммирования пиков: 5 pts Полярность ионов: положительная Режим сканирования: MS; Диапазон масс: от 50 до 1350 m/z; Усреднение: 3 Частота спектров: 3,00 Hz	Голова клапана: 6 Port Смещение торцевой пластины: 500 V; Напряжение на капилляре: 4000 V; Позиция источника: 1-2; Давление на небулайзере: 3.0 bar; Расход осушающего газа: 8,0 l/min; Температура осушающего газа.: 250°C;	Передача: Радиочастота воронки 1: 300 Vpp; Радиочастота воронки 2: 300 Vpp; Энергия низкоэнергетической диссоциации, индуцированной столкновениями: 0,0 eV; Радиочастота гексапольной ячейки соударений: 60,0 Vpp; Энергия квадрупольного иона: 5,0 eV; Нижняя граница масс: 50 m/z; Ячейка столкновений: Энергия столкновений: 10,0 eV Радиочастота столкновений: 500,0 Vpp; Время передачи: 60,0 μs Сохранение предимпульсов: 5,0 μs Калибровочная смесь: формиат натрия (в положительной ионизации)

Для идентификации и количественного определения 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-нитрозомочевины и специфических примесей А, В и С применяли ионизацию электрораспылением в режиме регистрации положительных ионов, детектирование проводили по базовому току наиболее интенсивных пиков (ВРС) на масс-хроматограмме. С целью возможности идентификации специфических примесей и возможных продуктов деградации, содержащихся в следовых количествах, анализировали растворы 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-нитрозомочевины с заведомо высокой концентрацией – 0,5 мг/мл. Время удерживания 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-нитрозомочевины составляло 6,3 мин, специфической примеси А – 4,7 мин, специфической примеси В – 5,1 мин, специфической примеси С – 5,6 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку примеси могут оказывать влияние на качество препарата и, как следствие, на эффективность лечения им, точное количественное определение их современными методами анализа является актуальной проблемой с позиции обеспечения безопасности здоровью пациентов. Согласно

Европейской фармакопее 7-ого издания, для неспецифических примесей, определяемых методом ВЭЖХ, допускается содержание не более 0,1% от площади основного пика, суммарно же их количество не должно превышать 1% от площади основного пика. Содержание специфических примесей А, В и С нормируется методом тонкослойной хроматографии, согласно которому, количество какой-либо из данных примесей не должно превышать 0,4% от интенсивности основного компонента. Применение метода ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения позволяет одновременно проводить анализ субстанции или готового препарата на содержание специфических и неспецифических примесей и снизить пределы детектирования данных соединений, что, в свою очередь, предполагает создание более совершенных методов контроля качества противоопухолевого препарата «Ломустин».

На рисунке 3 представлены хроматограммы свежеприготовленного раствора стандарта субстанции 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-нитрозомочевины в ацетонитриле.

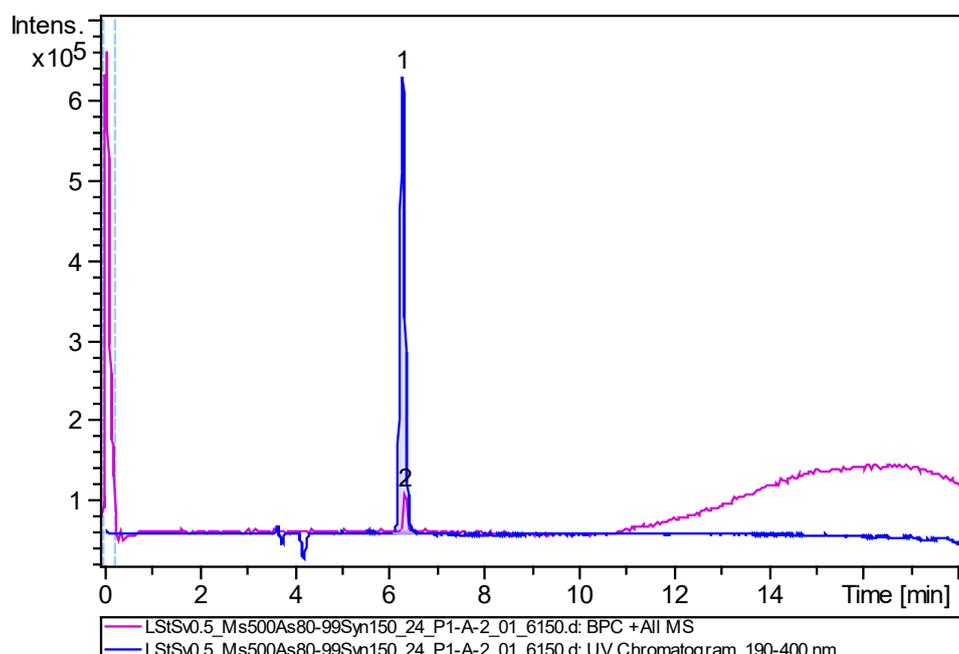


Рис. 3. Хроматограммы свежеприготовленного раствора стандарта субстанции 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-нитрозомочевины в ацетонитриле, 0,5 мг/мл, V=2 мкл.
1 – 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-нитрозомочевина, УФ, $\lambda = 190 - 400$ нм;
2 – 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-нитрозомочевина, Q-TOF, BPC+All MS.

Fig. 3. Chromatograms of a freshly prepared solution of the 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea substance standard in acetonitrile, 0,5 mg/mL, V=2 μ L.
1 – 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea, UV, $\lambda = 190 - 400$ nm;
2 – 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea, Q-TOF, BPC+All MS.

В таблице 2 приведены хроматографические и масс-спектрометрические характеристики компонентов свежеприготовленного раствора 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-нитрозомочевины в ацетонитриле.

Таблица 2. Хроматографические и масс-спектрометрические характеристики компонентов свежеприготовленного раствора 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-нитрозомочевины в ацетонитриле

Table 2. Chromatography and mass-spectrometry characteristics of the components of a freshly prepared solution of the 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea in acetonitrile

№ пика	Время удерживания, мин	Площадь	Интенсивность	Соотношение сигнал/шум	Хроматограмма	Значение Max. m/z
1	6,3	260562	21363	449,1	UV Chromatogram, 190-400 nm*	-
2	6,4	211975	105145	10,9	BPC +All MS**	205,1110

*Хроматограмма на диодно-матричном детекторе в диапазоне сканирования длин волн 190-400 нм

** масс-хроматограмма по основному иону максимальной интенсивности из всех масс-спектров 1-го порядка

Максимум поглощения 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-нитрозомочевины в детектируемой области составляет 234 нм (рис. 4).

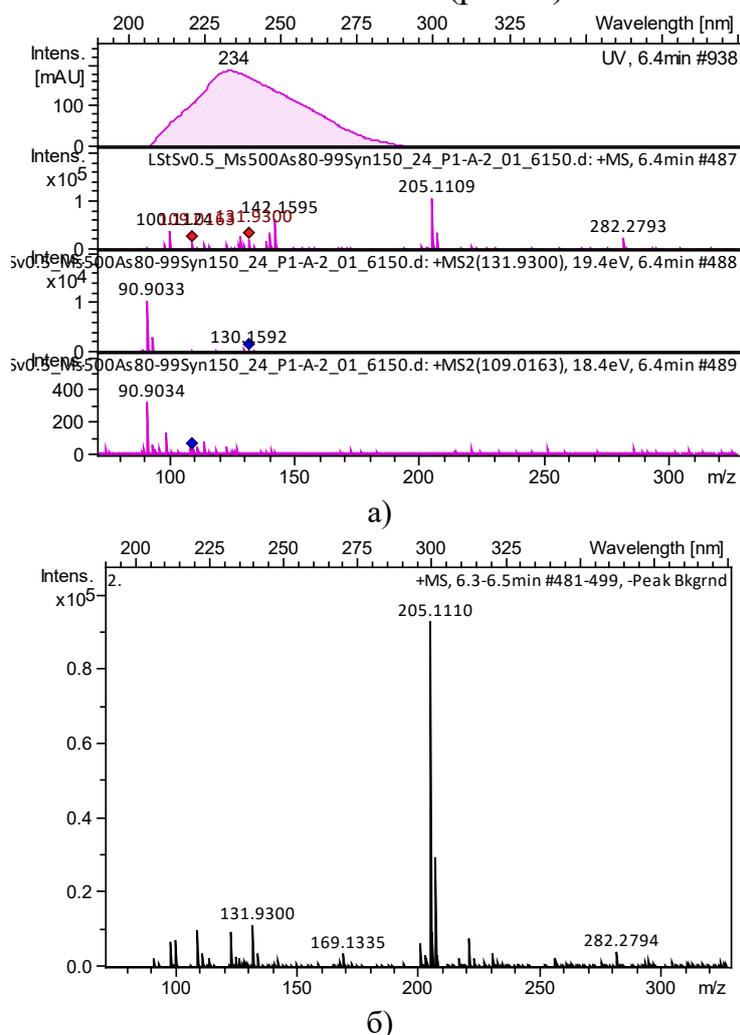


Рис. 4. УФ- (а) и масс-спектральные характеристики (б) 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-нитрозомочевины.

Fig. 4. UV- (a) and mass spectrum characteristics (b) of 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea.

Хроматограммы раствора стандарта субстанции 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-нитрозомочевины в ацетонитриле через 7 суток представлены на рисунке 5.

В таблице 3 приведены хроматографические и масс-спектрометрические характеристики компонентов раствора стандарта субстанции 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-нитрозомочевины в ацетонитриле через 7 суток.

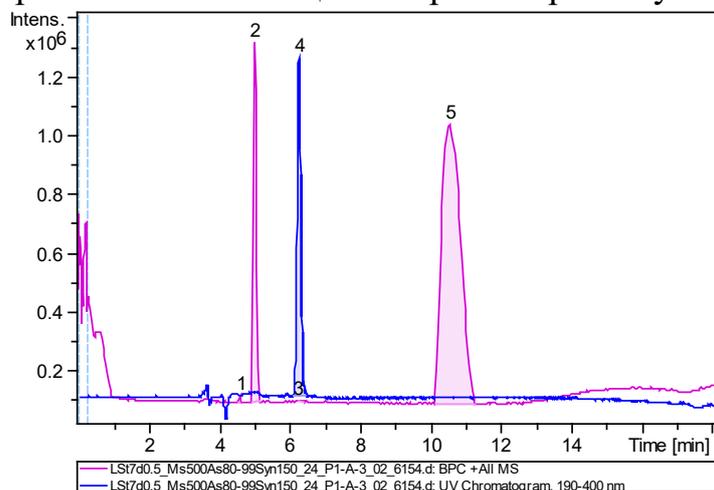


Рис. 5. Хроматограммы раствора стандарта субстанции 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-нитрозомочевины в ацетонитриле через 7 суток, 0,5 мг/мл, V=2 мкл.

1 – компонент пробы с Max. m/z = 143,1184, Q-TOF, BPC+All MS; 2 – специфическая примесь В, Q-TOF, BPC+All MS; 3 – 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-нитрозомочевина, Q-TOF, BPC+All MS; 4 – 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-нитрозомочевина, УФ, λ = 190 – 400 нм; 5- компонент пробы с Max. m/z = 169,1341, Q-TOF, BPC+All MS

Fig. 5. Chromatograms of a solution of the standard substance of 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea in acetonitrile after 7 days, 0,5 mg/mL, V=2 μL.

1 - sample component with Max. m / z = 143.1184, Q-TOF, BPC + All MS; 2 - specific impurity B, Q-TOF, BPC + All MS; 3 - 1- (2-chloroethyl) -3-cyclohexyl-1-nitrosourea, Q-TOF, BPC + All MS; 4 - 1- (2-chloroethyl) -3-cyclohexyl-1-nitrosourea, UV, = 190 - 400 nm; 5-component sample with Max. m / z = 169.1341, Q-TOF, BPC + All MS

Таблица 3. Хроматографические и масс-спектрометрические характеристики компонентов раствора стандарта субстанции 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-нитрозомочевины в ацетонитриле через 7 суток

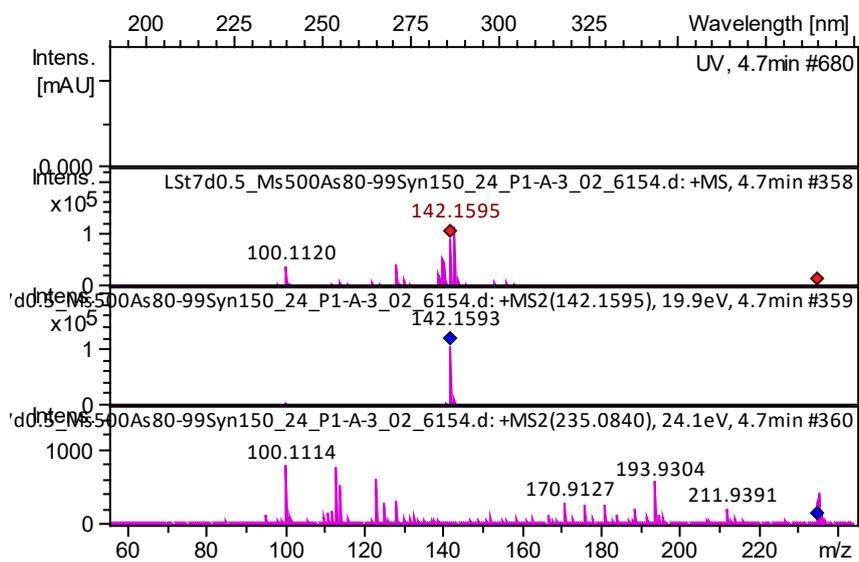
Table 3. Chromatography and mass-spectrometry characteristics of the components of a solution of the standard substance of 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea in acetonitrile after 7 days

№ пика	Время удерживания, мин	Площадь	Интенсивность	Соотношение сигнал/шум	Хроматограмма	Значение Max. m/z
1	4,7	88325	112754	4,2	BPC +All MS**	143,1184
2	5,1	8074431	1312201	234,0	BPC +All MS**	205,1108
3	6,3	36143	97562	0,8	BPC +All MS**	205,1107
4	6,3	211240	14973	372,2	UV Chromatogram, 190-400 nm*	-
5	10,6	35172444	1033536	181,5	BPC +All MS**	169,1341

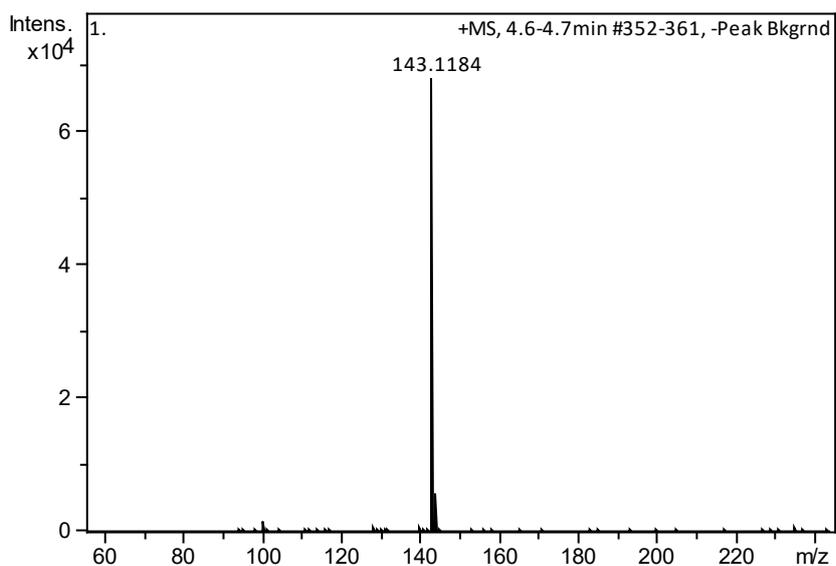
*Хроматограмма на диодно-матричном детекторе в диапазоне сканирования длин волн 190-400 нм;

** масс-хроматограмма по основному иону максимальной интенсивности из всех масс-спектров 1-го порядка

Максимум поглощения 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-нитрозомочевины в детектируемой области (190-400 нм) составляет 234 нм, специфическая примесь В и компоненты пробы с $\text{Max. } m/z = 143,1184$ и $169,1341$ не поглощают в детектируемой области спектра (рис. 6–9).



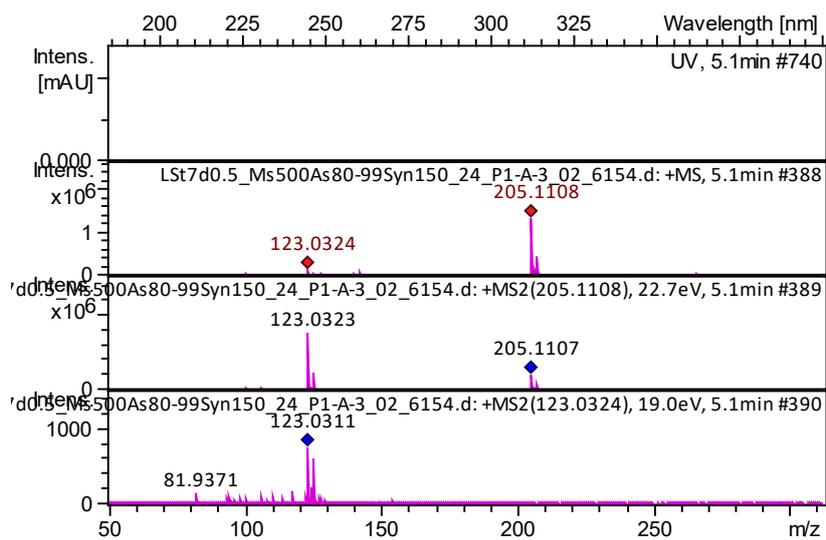
а)



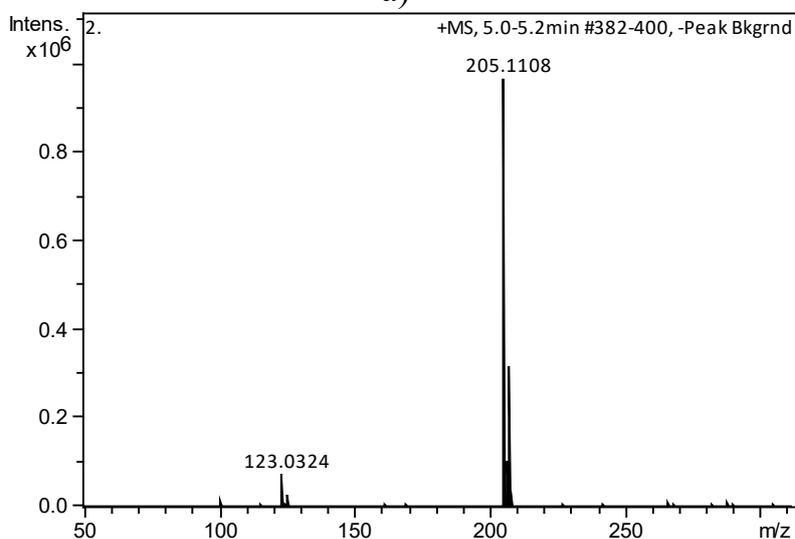
б)

Рис. 6. УФ- (а) и масс-спектральные характеристики (б) компонента пробы с $\text{Max. } m/z = 143,1184$.

Fig. 6. UV- (a) and mass spectrum characteristics (b) of component with $\text{Max. } m/z = 143,1184$



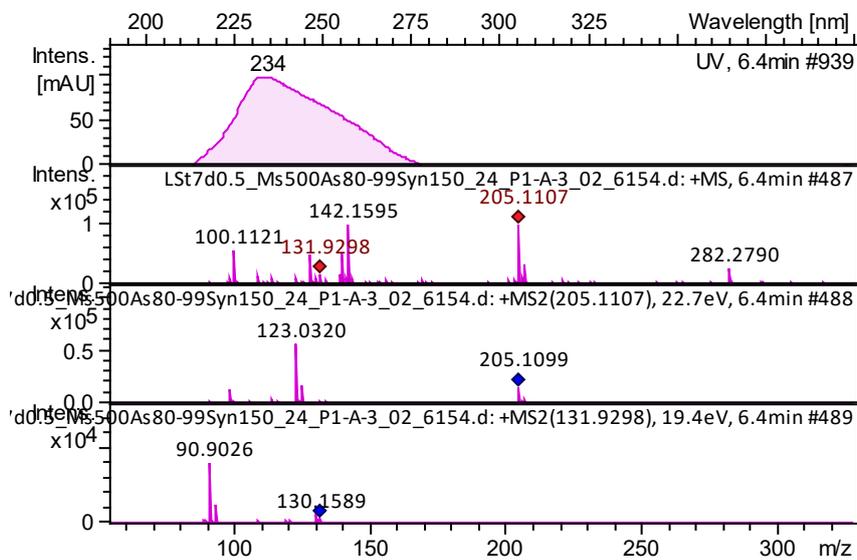
а)



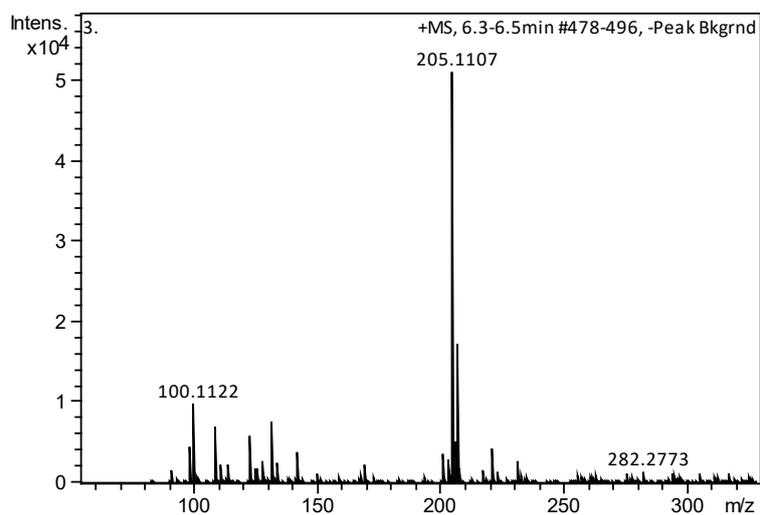
б)

Рис. 7. УФ- (а) и масс-спектральные характеристики (б) специфической примеси В.

Fig. 7. UV- (a) and mass spectrum characteristics (b) of specific impurities B.



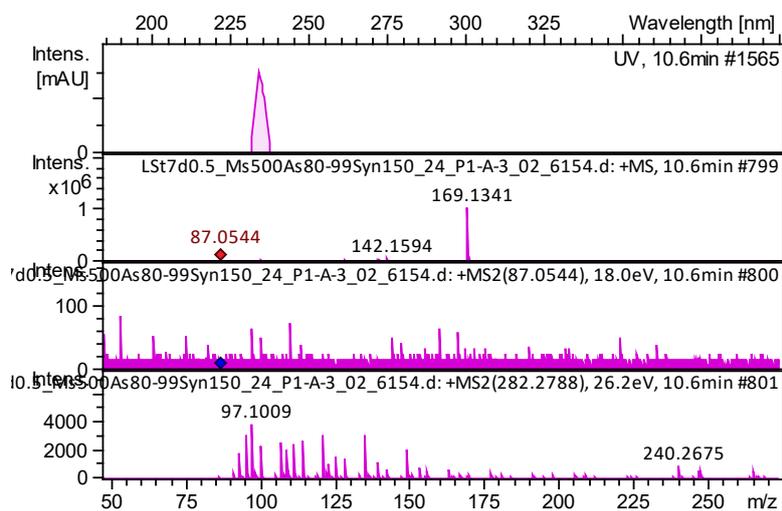
а)



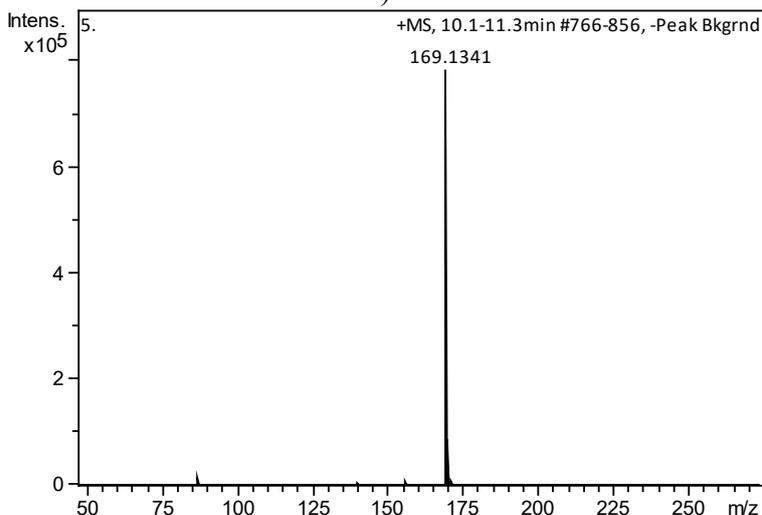
б)

Рис. 8. УФ- (а) и масс-спектральные характеристики (б) 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-нитрозомочевины.

Fig. 8. UV- (a) and mass spectrum characteristics (б) of 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea



а)



б)

Рис. 9. УФ- (а) и масс-спектральные характеристики (б) компонента пробы с Max. m/z = 169,1341.

Fig. 9. UV- (a) and mass spectrum characteristics (б) of component with Max. m/z = 169,1341.

На рисунке 10 представлены хроматограммы свежеприготовленного раствора стандарта специфической примеси В в ацетонитриле.

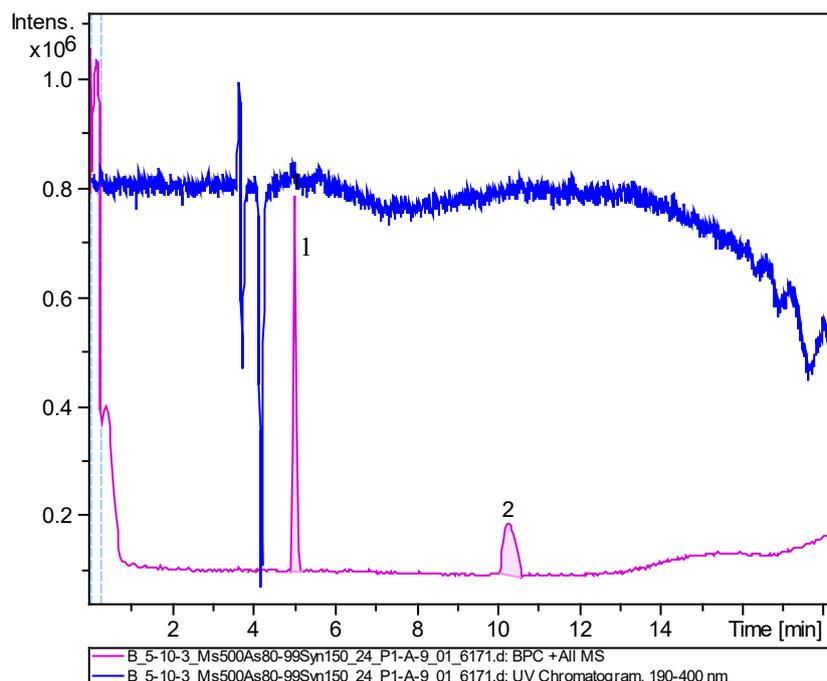


Рис. 10. Хроматограммы свежеприготовленного раствора стандарта специфической примеси В в ацетонитриле, $5 \cdot 10^{-3}$ мг/мл, $V=2$ мкл. 1 – специфическая примесь В, Q-TOF, BPC+All MS; 2 – компонент пробы с Max. $m/z = 169,1341$, Q-TOF, BPC+All MS

Fig. 10. Chromatograms of a freshly prepared solution of the standard for specific impurity B in acetonitrile, $5 \cdot 10^{-3}$ mg/mL, $V=2$ μ L. 1 – specific impurity B, Q-TOF, BPC + All MS; 2 – component sample with Max. $m/z = 169.1341$, Q-TOF, BPC + All MS

В таблице 4 представлены хроматографические и масс-спектрометрические характеристики компонентов свежеприготовленного раствора специфической примеси В в ацетонитриле.

Таблица 4. Хроматографические и масс-спектрометрические характеристики компонентов свежеприготовленного раствора специфической примеси В в ацетонитриле

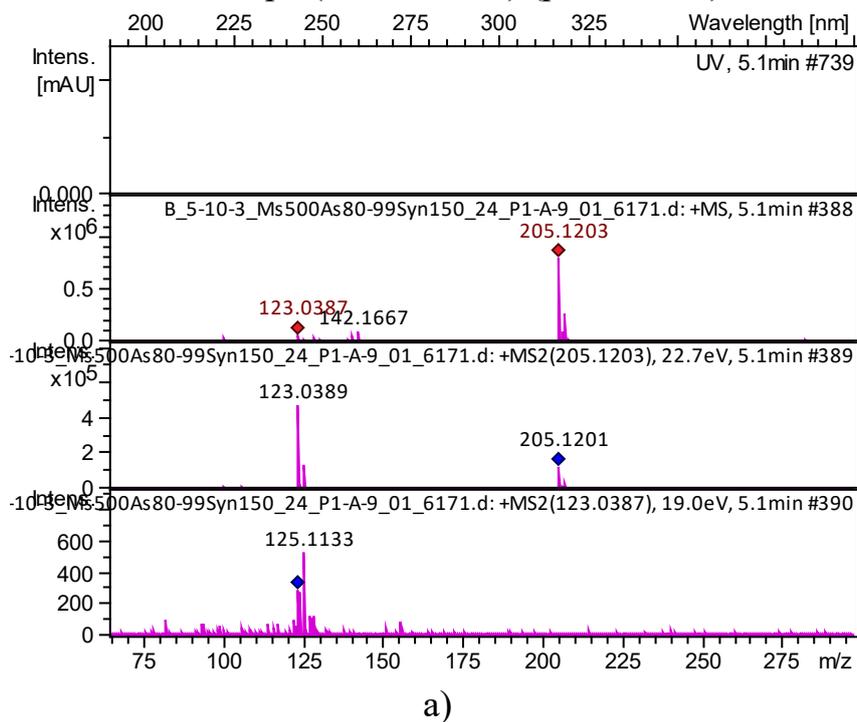
Table 4. Chromatography and mass-spectrometry characteristics of the components of a freshly prepared solution of the standard for specific impurity B in acetonitrile

№ пика	Время удерживания, мин	Площадь	Интенсивность	Соотношение сигнал/шум	Хроматограмма	Значение Max. m/z
1	5,1	4451517	786500	123,6	BPC +All MS	205,1203
2	10,3	1923709	185251	17,2	BPC +All MS	169,1423

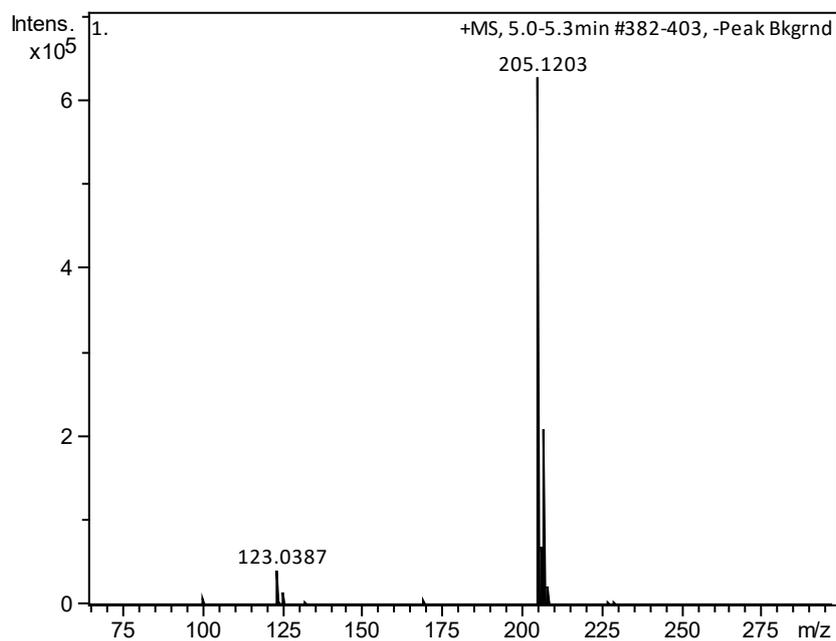
*Хроматограмма на диодно-матричном детекторе в диапазоне сканирования длин волн 190-400 нм

** масс-хроматограмма по основному иону максимальной интенсивности из всех масс-спектров 1-го порядка

Специфическая примесь В и компонент пробы свежеприготовленного раствора специфической примеси В с $m/z = 169,1423$ не поглощают в детектируемой области спектра (190–400 нм) (рис. 11–12).



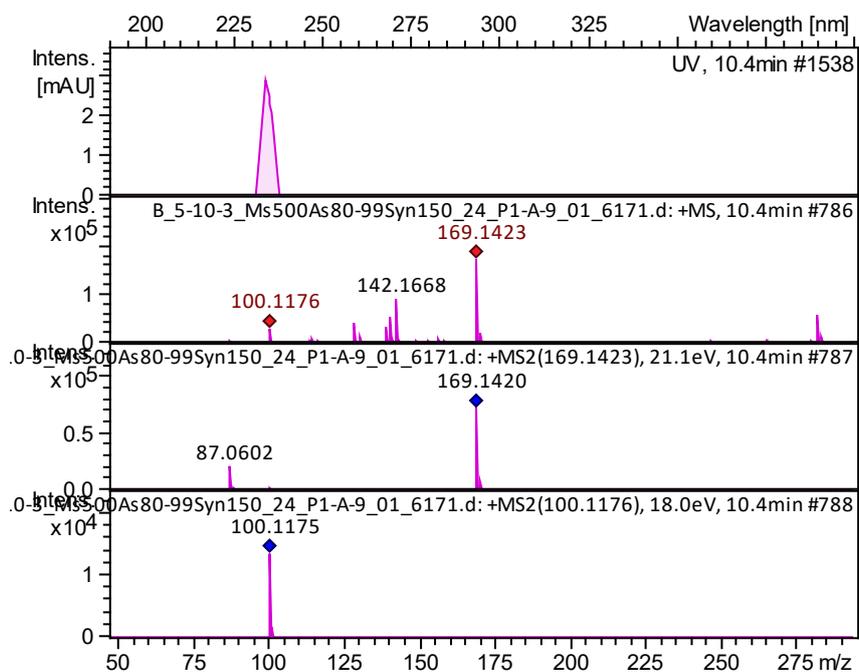
а)



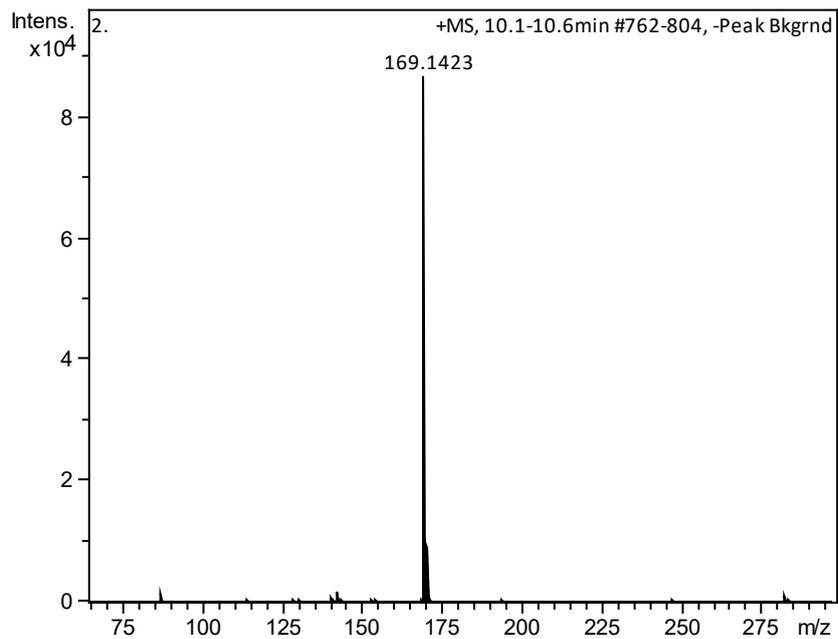
б)

Рис. 11. УФ- (а) и масс-спектральные характеристики (б) специфической примеси В.

Fig. 11. UV- (a) and mass spectrum characteristics (b) of specific impurities B.



a)



б)

Рис. 12. УФ- (а) и масс-спектральные характеристики (б) компонента пробы с Max. $m/z = 169,1423$.

Fig. 12. UV- (a) and mass spectrum characteristics (b) of component with Max. $m/z = 169,1423$.

На рисунке 13 представлены хроматограммы свежеприготовленного раствора стандарта специфической примеси С в ацетонитриле.

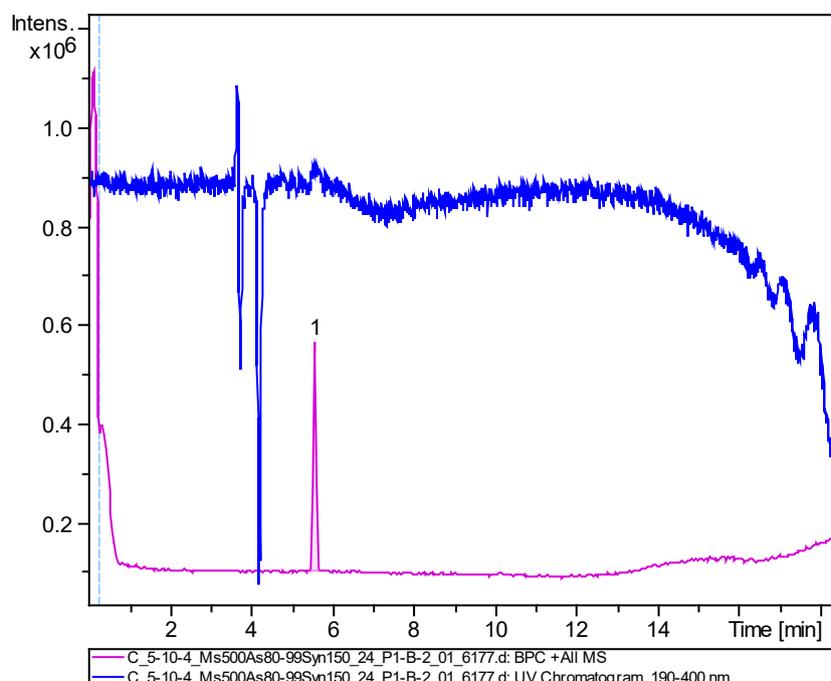
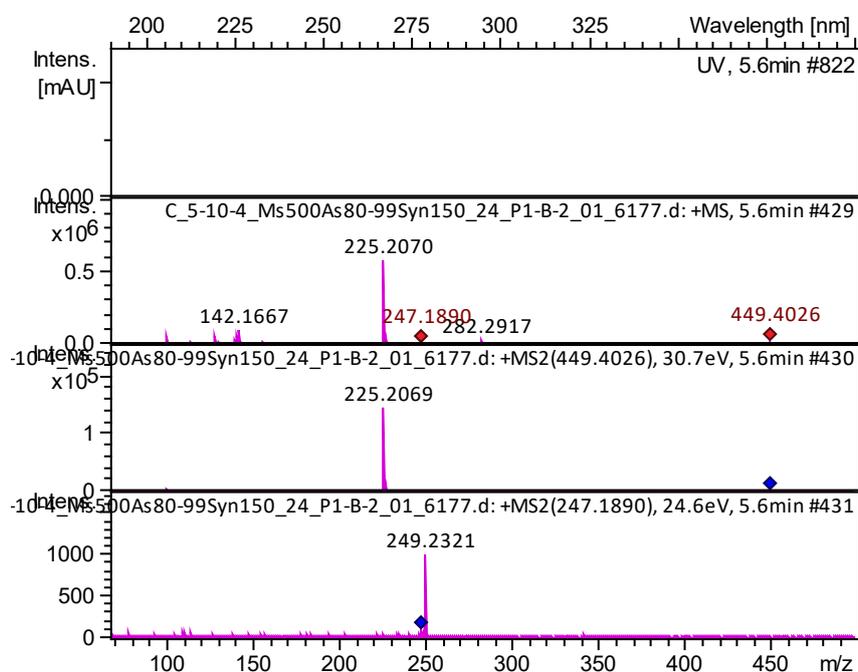


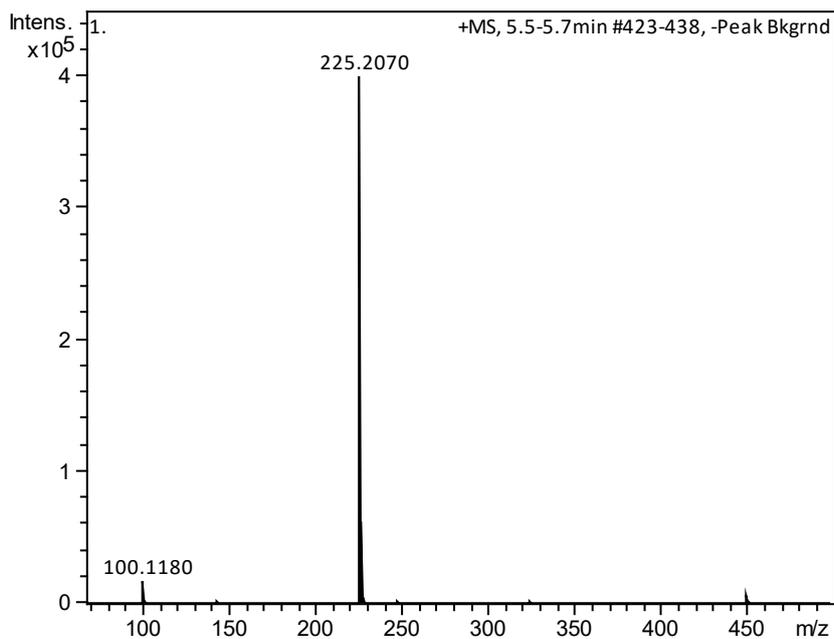
Рис. 13. Хроматограммы свежеприготовленного раствора стандарта специфической примеси С в ацетонитриле, $5 \cdot 10^{-4}$ мг/мл, $V=2$ мкл. 1 – специфическая примесь С, Q-TOF, BPC+All MS

Fig. 13. Chromatograms of a freshly prepared solution of the standard for specific impurity C in acetonitrile, $5 \cdot 10^{-4}$ mg/mL, $V=2$ μ L. 1 – specific impurity C, Q-TOF, BPC + All MS

Специфическая примесь С не поглощает в детектируемой области спектра (190-400 нм) (рис. 14).



a)



б)

Рис. 14. УФ- (а) и масс-спектральные характеристики (б) специфической примеси С.

Fig. 14. UV- (a) and mass spectrum characteristics (b) of specific impurities С.

На рисунке 15 представлены хроматограммы свежеприготовленного раствора стандарта специфической примеси А в ацетонитриле.

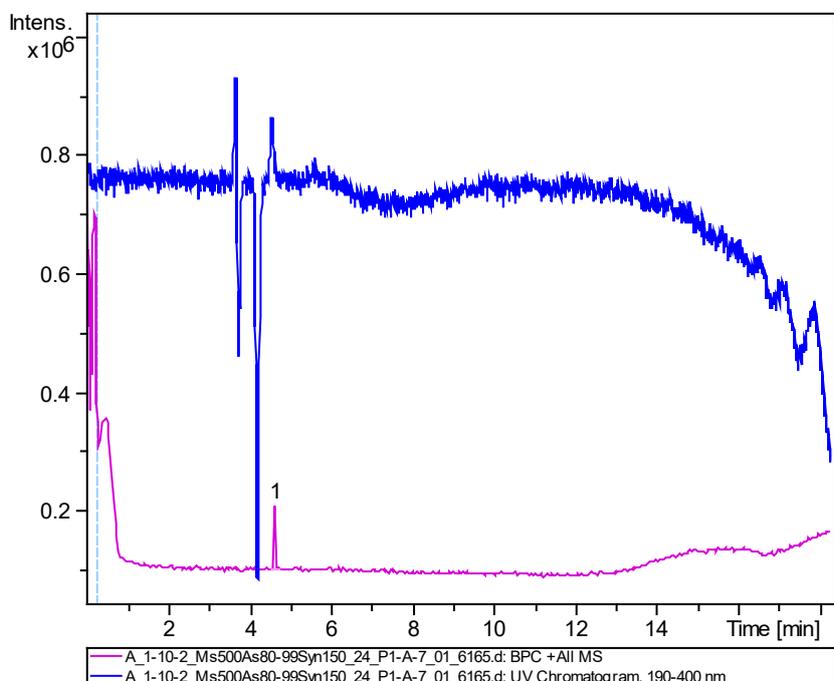
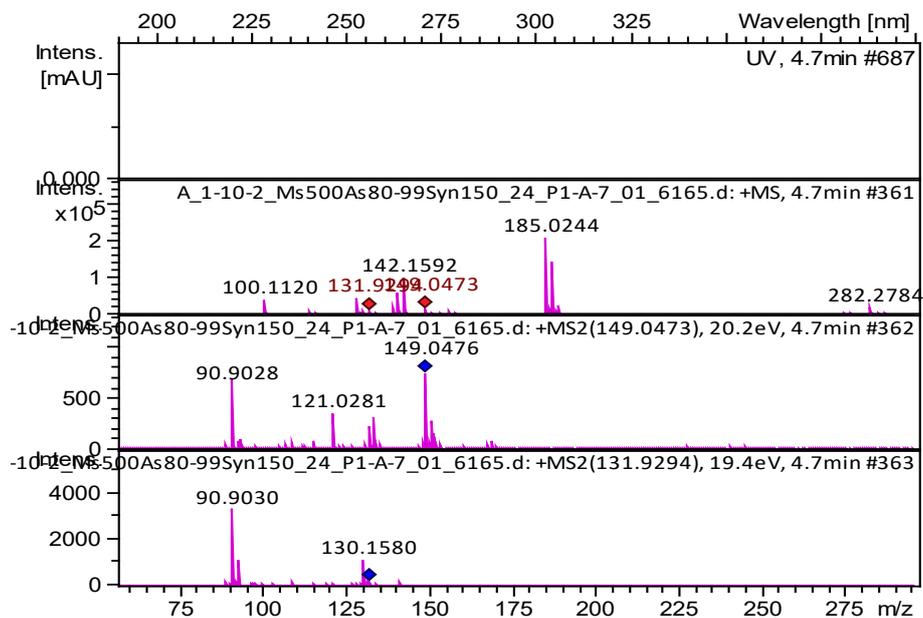


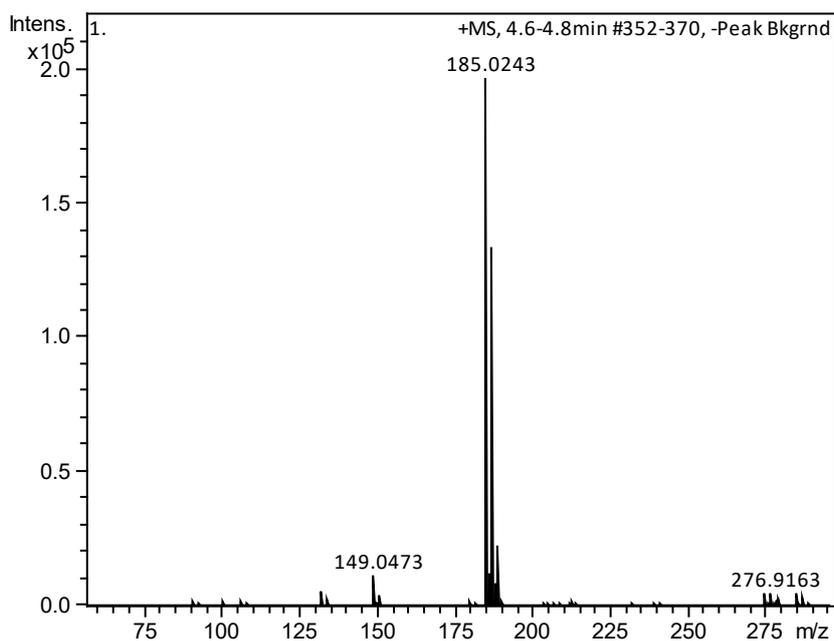
Рис. 15. Хроматограммы свежеприготовленного раствора стандарта специфической примеси А в ацетонитриле, $1 \cdot 10^{-2}$ мг/мл, V=2 мкл.

Fig. 15. Chromatograms of a freshly prepared solution of the standard for specific impurity А in acetonitrile, $1 \cdot 10^{-2}$ mg/mL, V=2 μ L.

Специфическая примесь А не поглощает в детектируемой области спектра (190-400 нм) (рис. 16).



а)



б)

Рис. 16. УФ- (а) и масс-спектральные характеристики (б) специфической примеси А.
Fig. 16. UV- (a) and mass spectrum characteristics (b) of specific impurities А.

Согласно полученным данным нами показано, что хранение растворов стандарта ломустина в ацетонитриле в течение 7 суток при плюс 4°C, сопровождается частичной деструкцией 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-

нитрозомочевины с образованием специфической примеси В. В свою очередь, специфическая примесь В разлагается в течение нескольких часов с образованием характерного продукта деградации с $m/z=169,1423$. Молекулярная масса ионизированного вещества может принадлежать 1-циклогексил-3-винилмочевине или *N*-циклогексилазиридин-1-карбоксамиду ($M=168,24$ г/моль), которые, вероятнее всего образуются при отщеплении хлористого водорода от специфической примеси В (рис.17).

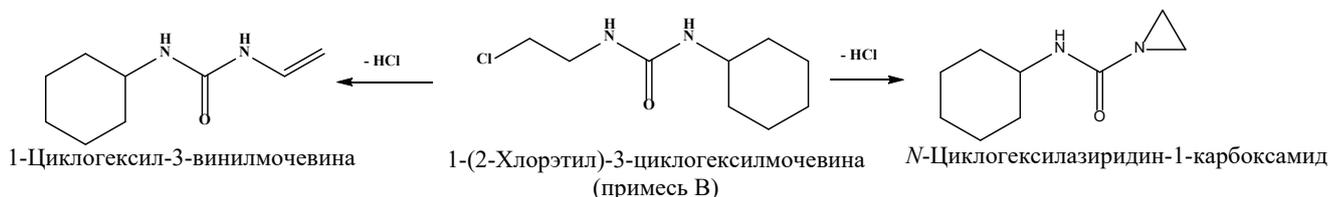


Рис. 17. Схема образования 1-циклогексил-3-винилмочевины и *N*-циклогексилазиридин-1-карбоксамид.

Fig. 17. Scheme of appearance of 1-cyclohexyl-3-vinylurea and *N*-cyclohexylaziridine-1-carboxamide.

Точную природу образующейся примеси с $m/z=169,1423$ нам предстоит выявить на следующем этапе работ. Отметим, что в Европейской фармакопее обнаруженная нами примесь, среди специфических, не упоминается, в то же время теоретический анализ возможных механизмов ее образования, по нашему мнению, позволяет отнести ее именно к этой категории примесей. Таким образом, предложенный нами метод и условия идентификации сопутствующих основному веществу соединений позволили выявить новый компонент, определение которого, наряду с регламентируемыми Европейской фармакопеей примесями, мы считаем также необходимым, поскольку при хранении растворов ломустина обнаруженный компонент оказывается мажорной примесью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанный нами ВЭЖХ-МС/МС метод разделения и анализа специфических примесей А, В и С в составе субстанции препарата «Ломустин», позволяет проводить идентификацию специфических примесей и продуктов деградации действующего вещества. Анализ свежеприготовленного раствора стандарта субстанции 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-нитрозомочевины показал отсутствие специфических примесей А, В и С в его составе. В ходе исследования установлено, что в процессе хранения растворов стандарта субстанции в течение 7 суток при температуре плюс 4°C происходит частичная деструкция 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-нитрозомочевины с образованием специфической примеси В в количестве 1,8% в пересчете на основное вещество. Предложенный нами метод анализа обладает высокой чувствительностью по данному соединению и может быть применен для выявления специфической примеси В при низких содержаниях ее в составе лекарственного препарата ($5 \cdot 10^{-3}$ мг/мл). Также метод показал высокую

чувствительность к специфической примеси С ($5 \cdot 10^{-4}$ мг/мл). Выявление специфической примеси А в условиях предложенного метода возможно на уровне $1 \cdot 10^{-2}$ мг/мл, при этом повышение чувствительности к примеси А возможно за счет выбора иных параметров масс-спектрометрического детектирования. Новизной предложенного метода явилось выявление не регламентируемой Европейской фармакопеей примеси с $m/z=169,1423$, образующейся при хранении растворов ломустина, природу которой предстоит определить в дальнейших исследованиях.

Дальнейшее усовершенствование методики и определение валидационных характеристик позволит рекомендовать метод для контроля качества при производстве, транспортировке и хранении субстанции препарата «Ломустин» по показателю «Примеси».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

CONFLICT OF INTERESTS:

The authors declare no conflict of interests.

Список литературы:

1. Распоряжение Правительства РФ Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения на 2020 год (утв. Председателем Правительства РФ 12.10.2019 №2406-р).
2. Регистр лекарственных средств. https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_533.htm (дата обращения 04.03.2021).
3. Массив данных Drugbank. <https://go.drugbank.com/drugs/DB01206> (дата обращения 04.03.2021).
4. Вартанян Р.С. (2005) *Синтез основных лекарственных средств*. М.: Мед. информ. агентство (МИА).
5. European pharmacopoeia 7.0. 07/2010: 0928 Lomustine.
6. Al-Shammery, F. J. (1990). Analytical profile of lomustine. *Analytical Profiles of Drug Substances*. 19, 315– 340.
7. Снайдер Л.Р., Кирклэнд Дж., Долан Дж. У. (2020) *Введение в современную жидкостную хроматографию*. М.: Техносфера.

References:

1. Order of the Government of the Russian Federation. Order on approval of the list of vital and essential medicines for medical use for 2020. Approved by the Chairman of the Government of the Russian Federation 12.10.2019 №2406 (in Russ.).
2. Register of medicines https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_533.htm (accessed 04.03.2021).
3. Database Drugbank <https://go.drugbank.com/drugs/DB01206> (accessed 04.03.2021);
4. Vartanyan R.S. (2005) *Synthesis of essential drugs*. М.: MIA (in Russ.).
5. European pharmacopoeia 7.0. 07/2010: 0928 Lomustine.
6. Al-Shammery, F. J. (1990). Analytical profile of lomustine. *Analytical Profiles of Drug Substances*. 19, 315– 340.
7. Snyder L.R., Kirkland J., Dolan J. W. (2020) *Introduction To Modern Liquid Chromatography*. М.: Technosfera (in Russ.).