

А. В. Тарасюк, Н. М. Сазонова, А. Н. Шумский, А. Л. Некрашевич,  
П. И. Антипов, Л. М. Гаевая, Л. Н. Грушевская, С. В. Минаев

## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И РАЗРАБОТКА МЕТОДИК АНАЛИЗА СУБСТАНЦИИ ОРИГИНАЛЬНОГО АНТИДЕПРЕССАНТА ГСБ-106

ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова”, Россия, 125315, Москва, Балтийская, 8;  
tarasiuk86@gmail.com

В НИИ фармакологии В. В. Закусова на основе структуры бета-изгиба 4-й петли мозгового нейротрофического фактора (BDNF) был сконструирован его димерный дипептидный миметик — ГСБ-106, представляющий собой гексаметилендиамид *бис*-(*N*-моносукцинил-*L*-серил-*L*-лизина). В настоящее время ГСБ-106 развивается как антидепрессант с BDNF-эргическим механизмом действия. В данной работе изучены физико-химические свойства и разработана методика анализа субстанции ГСБ-106. Определены основные фармакопейные показатели качества, получены ИК- и ЯМР-спектры образцов субстанции. Разработана методика определения посторонних примесей в субстанции методами ТСХ и ВЭЖХ.

**Ключевые слова:** ГСБ-106; миметик BDNF; фармацевтический анализ; ВЭЖХ; ТСХ; ИК-спектроскопия.

В ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова” в рамках оригинальной гипотезы о ведущей роли бета-изгибов в распознавании белковых лигандов рецептором на основе структуры бета-изгиба наиболее экспонированной наружу 4-й петли BDNF сконструирован и синтезирован его дипептидный миметик ГСБ-106 — гексаметилендиамид *бис*-(*N*-моносукцинил-*L*-серил-*L*-лизина) [1 – 3].

Нейропротекторная активность ГСБ-106 была показана в интервале концентраций  $10^{-5}$  –  $10^{-8}$  М с использованием иммортализованных гиппокампальных мышечных нейронов линии HT-22 и клеток нейробластомы человека линии SH-SY5Y в условиях окислительного стресса, глутаматной и 6-оксидофаминовой нейротоксичности [4].

Антидепрессивная активность ГСБ-106 была выявлена как при внутрибрюшинном, так и при пероральном введении грызунам в интервале доз 0,1 – 10,0 мг/кг. Эффекты были получены на различных моделях депрессивноподобного состояния как в тестах, моделирующих состояние отчаяния — неизбежного плавания по Порсолту, вынужденного плавания в сосуде с вращающимися колесами по Номуре, подвешивания за хвост по Стеру, так и в основанной на стрессе модели выученной беспомощности [5].

Настоящие исследования проведены в рамках фармацевтической разработки нового лекарственного средства — антидепрессанта ГСБ-106 — и посвящены изучению его физико-химических свойств и разработке методик анализа.

### Экспериментальная часть

Анализ проведен на 3 образцах субстанции ГСБ-106, синтезированных в отделе химии лекарственных средств ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова”. При разработке методик были исполь-

зованы образцы промежуточных продуктов синтеза: дициклогексилмочевины (1), *Z*-*L*-SerOH (4), *Z*-*L*-Ser-OPfp (5), (*Z*-*L*-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (8), (*H*-*L*-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (9), (*Z*-*L*-Ser-*L*-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (10), (*H*-*L*-Ser-*L*-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (11), (HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CO-*L*-Ser-*L*-Lys(Boc)-NH-)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> (12), также синтезированных в отделе химии лекарственных средств ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова”. Образцы *N*-гидроксиукцинимиды (2), *N,N*-диметил-1,3-пропандиамина (3), пентафторфенола (6) (Alfa Aesar, Великобритания), а также образец гексаметилендиамина (7) (Sigma-Aldrich, США) получены от указанных производителей.

ИК-спектры получены на ИК-спектрофотометре Vertex 70 (“Bruker”, Германия) в таблетках KBr (1 мг ГСБ-106 на 200 мг KBr).

Спектры <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР регистрировали по шкале δ, м.д. на спектрометре Bruker FOURIER 300 HD (300 и 75 МГц, соответственно) в растворах DMSO-d<sub>6</sub> и D<sub>2</sub>O:H<sub>2</sub>O = 1:9, внутренний стандарт тетраметилсилан (0 м.д.).

Разделение в тонких слоях сорбента проведено на пластинках с алюминиевой и стеклянной подложкой DC Kieselgel 60 G/F<sub>254</sub> (Merck, Германия) в системах растворителей: этилацетат (А); гексан — этилацетат (1:1) (Б); гексан — этилацетат (1:5) (В); диоксан — H<sub>2</sub>O (9:1) (Г); CHCl<sub>3</sub> — MeOH — лед. AcOH (80:10:1) (Д); бензол — MeOH (1:4) (Е); MeOH — H<sub>2</sub>O (2:1) (Ж); MeOH — лед. AcOH — H<sub>2</sub>O (4:1:2) (З); MeOH — лед. AcOH — H<sub>2</sub>O (4:2:1) (И); CHCl<sub>3</sub> — MeOH — лед. AcOH — H<sub>2</sub>O (8:10:2:3) (К); CHCl<sub>3</sub> — MeOH — лед. AcOH — H<sub>2</sub>O (15:10:2:3) (Л); *n*-бутанол — лед. AcOH — H<sub>2</sub>O (3:1:1) (М). Аминосодержащие соединения обнаруживали нингидрином, соединения с амидными группами — хлортолидиновой пробой, соединения, содержащие ароматические группы — в УФ-лучах.

**Приготовление раствора толидина.** В емкость темного стекла объемом 1 л помещали навеску 160 мг о-толидина, 1 г KI, приливали 30 мл ледяной уксусной кислоты и 500 мл дистиллированной воды, перемешивали. **Проявление хроматограммы.** Пластинку помещали в атмосферу хлора (свежеприготовленного из 1,5 % раствора  $KMnO_4$  и 10 % раствора  $HCl$ ) на 2 – 3 мин. Затем пластинку оставляли на 3 – 5 мин под током воздуха для удаления избытка хлора, далее опускали в раствор толидина на 5 с, промывали пластинку водой.

Анализ методом ВЭЖХ проведен на жидкостном хроматографе Wellchrom 2001 (KNAUER, Германия) с УФ-детектором, фиксированным объемом петли 20 мкл, на стальной колонке длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,0 мм, заполненной сорбентом C16 с размером частиц 5 мкм (Диасфер-110-C16).

Определение остаточных органических растворителей проведено на газовом хроматографе Agilent 7890B с масс-селективным детектором Agilent 7000 с одно-квадрупольным детектором и парофазным пробоотборником PAL3 (“Agilent Technologies”, США).

Количественное определение проводили методом Кьельдаля. Минерализацию проб проводили на аппарате DK 6 (VELPscientifica, Италия) с вакуумным насосом JP и скруббером SMS (VELPscientifica, Италия). Перегонку с водяным паром проводили на приборе UDK 139 (VELPscientifica, Италия).

### Результаты и их обсуждение

По химической структуре соединение ГСБ-106 представляет собой гексаметилендиамид *бис*-(*N*-моно-сукцинил-*L*-серил-*L*-лизина) (рис. 1). По внешнему виду субстанция ГСБ-106 — белый кристаллический порошок, легко растворимый в воде, практически нерастворимый в этаноле, хлороформе, диэтиловом эфире, мало растворимый в ДМСО.

Субстанция ГСБ-106 плавится в интервале температур от 159 до 163 °С с разложением. Растворы 2 % ГСБ-106 в воде по мутности не превышают эталон I (ГФ XIII), растворы бесцветные, pH от 4,63 до 4,73. Потеря в массе при высушивании субстанции, опреде-

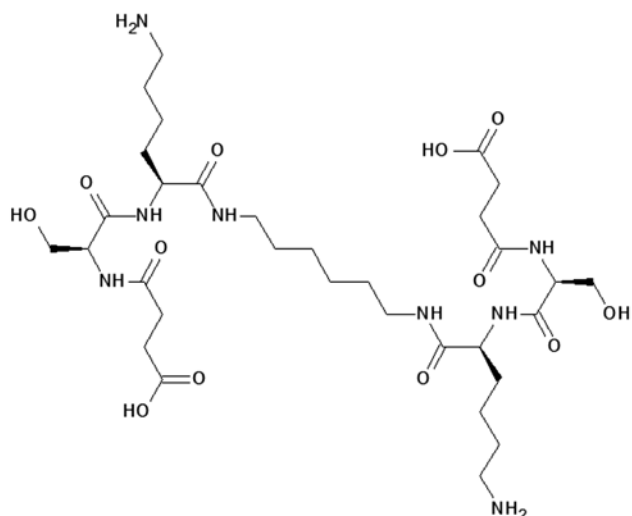


Рис. 1. Структурная формула ГСБ-106.

ляемая при температуре  $(60 \pm 1)$  °С и остаточном давлении, не превышающем 15 мм рт. ст. в течение 3 ч над  $CaCl_2$ , составляла не более 5,0 %. Указанные условия были выбраны в связи с возможным разложением субстанции на воздухе.

В ИК-спектре ГСБ-106, снятом в таблетках калия бромида (рис. 2) присутствуют характеристические полосы поглощения ( $cm^{-1}$ ): 3400 — валентные колебания О-Н гидроксильной группы серина; 3282 и 3090 — валентные колебания NH амидных групп и ω-NH<sub>2</sub>-группы лизина; 2930 и 2850 — валентные колебания С-Н (СН<sub>2</sub>-групп); валентные колебания С=О карбоксильной группы накладываются на полосу 1650 — валентных колебаний С=О “амид I”; 1558 деформационные колебания N-H “амида II”, 1402 — валентные колебания С=О карбоксильной группы; 1260 — деформационные колебания О-Н карбоксильной группы; 1170 — валентные колебания С-О гидроксильной группы серина (рис. 2).

В ПМР-спектре (ДМСО-d<sub>6</sub>, 20 °С) присутствуют сигналы всех фрагментов молекулы (рис. 3). Характерными являются следующие сигналы: 1,15 – 1,25 (4 Н, м, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-), 1,20 – 1,38 (8 Н, м, 2 С<sup>α</sup>H<sub>2</sub> Lys, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-),

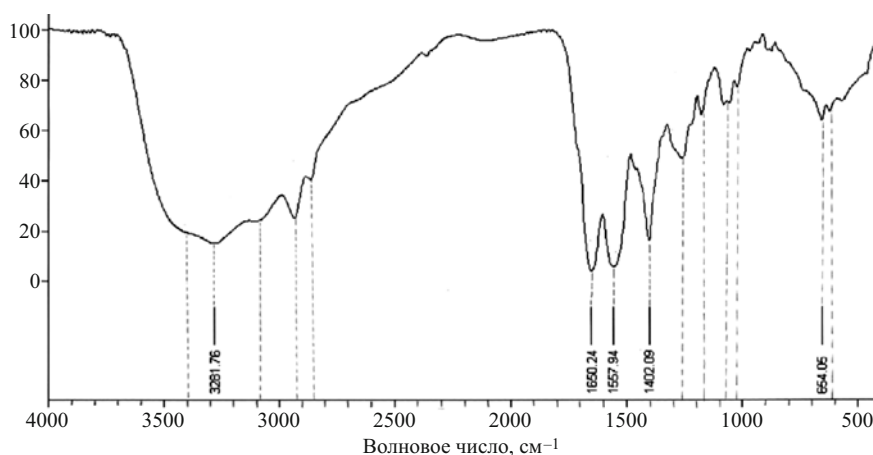


Рис. 2. ИК-спектр ГСБ-106 (KBr).

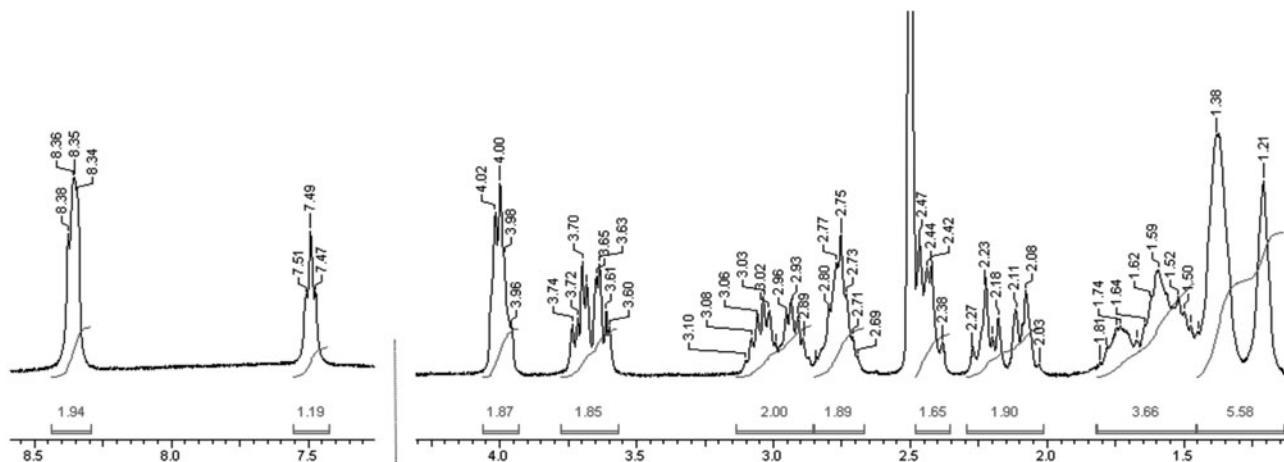


Рис. 3. ПМР-спектр ГСБ-106 (DMCO-d<sub>6</sub>).

1,38 – 1,68 (4 H, м, 2 C<sup>δ</sup>H<sub>2</sub> Lys), 1,59 и 1,74 (4 H, два м, 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Lys), 2,01 – 2,50 (8 H, м, 2 HOOC-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-), 2,69 – 2,80 (4 H, м, 2 C<sup>ε</sup>H<sub>2</sub> Lys), 2,93 – 3,01 (4 H, м, -NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-), 3,60 – 3,74 (4 H, м, 2 C<sup>β</sup>H<sub>2</sub> Ser), 4,00 (4 H, м, 2 C<sup>α</sup>H Lys, 2 C<sup>α</sup>H Ser), 7,49 (2 H, т, J 5,4 Гц, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH-), 8,31 (2 H, д, J 5,8 Гц, 2 NH Ser), 8,40 (2 H, д, J 7,8 Гц, 2 NH Lys).

В спектре <sup>13</sup>C ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>, 20 °C) присутствуют сигналы всех углеродных ядер (δ, м.д.): 22,2 (C<sup>γ</sup> Lys), 26,4 (C<sup>3</sup>, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-), 26,5 (C<sup>δ</sup> Lys), 29,1 (C<sup>2</sup>, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-), 29,8 (C<sup>β</sup> Lys), 32,6 и 23,6 (HOOC-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-), 37,6 (C<sup>ε</sup> Lys), 39,1 (C<sup>1</sup>, -NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-), 54,4 (C<sup>α</sup> Lys), 57,6 (C<sup>α</sup> Ser), 61,2 (C<sup>β</sup> Ser), 171,0 (CO- Ser), 172,1 (CO- Lys), 175,6 (HOOC-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-), 177,4 (HOOC-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-) (рис. 4).

ИК, ПМР и ЯМР <sup>13</sup>C спектры всех образцов субстанции были практически идентичны. Полученные спектры подтверждают химическую структуру соеди-

нения ГСБ-106 и могут быть применены для его идентификации в субстанции.

Для подтверждения присутствия в структуре молекулы ГСБ-106 пептидных связей была также проведена биуретовая реакция. Для проведения этой реакции к 1 мл 2 % раствора субстанции ГСБ-106 в воде очищенной прибавляли 1 мл 10 % раствора натрия гидроксида и затем осторожно по каплям прибавляли 1 % раствор меди(II) сульфата. Раствор окрашивался в фиолетовый цвет.

Чистота субстанции ГСБ-106 была изучена с помощью методов ТСХ и ВЭЖХ хроматографии. В качестве свидетелей использовали исходные и вспомогательные соединения, а также промежуточные продукты синтеза — соединения **1** – **12** (см. экспериментальную часть). Хроматографирование в тонких слоях сорбента проведено на стеклянных пластинах Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck), поскольку на этих пластинах наблюдалось

Таблица 1

Результаты хроматографирования ГСБ-106 и примесей 1 – 12

Элюирующая система		R <sub>f</sub> примеси												
		ГСБ-106	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А	Этилацетат	0	0,68	0	0	0	0,82	0,83	0	0,51	0	0	0	0
Б	Гексан — Этилацетат (1:1)	0	0,35	0	0	0	0,32	0,52	0	0,02	0	0	0	0
В	Гексан — Этилацетат (1:5)	0	0,64	0,04	0,04	0,03	0,77	0,88	0	0,33	0	0,14	0	0
Г	Диоксан — H <sub>2</sub> O (9:1)	0,02	0,89	0,85	0,03	0,72	1	0,89	0	0,92	0,22	0,92	0,05	0,57
Д	CHCl <sub>3</sub> — MeOH — лед. AcOH (80:10:1)	0	0,91	0,16	0,05	0,03	0,76	0,69	0	0,75	0	0,41	0	0
Е	Бензол — MeOH (1:4)	0	0,91	0,78	0,10	0,86	0,89	0,88	0,03	0,93	0,29	0,90	0,16	0,79
Ж	MeOH — H <sub>2</sub> O (2:1)	0,51	хвост	0,81	0,05	0,91	0,93	0,94	0,03	0,96	0,12	1	0,35	1
З	MeOH — лед. AcOH — H <sub>2</sub> O (4:1:2)	0,80	0,95	0,87	0,62	1	1	1	0,71	1	0,89	1	0,93	0,99
И	MeOH — лед. AcOH — H <sub>2</sub> O (4:2:1)	0,69	0,95	0,86	0,66	0,94	0,96	0,98	0,72	0,99	0,91	0,99	0,97	0,98
К	CHCl <sub>3</sub> — MeOH — лед. AcOH — H <sub>2</sub> O (8:10:2:3)	0,52	1	0,85	0,49	0,91	1	1	0,47	1	0,98	1	0,97	1
Л	CHCl <sub>3</sub> — MeOH — лед. AcOH — H <sub>2</sub> O (15:10:2:3)	0,22	0,99	0,73	0,37	0,75	0,95	0,98	0,34	1	0,89	0,99	0,74	0,95
М	n-Бутанол — лед. AcOH — H <sub>2</sub> O (3:1:1)	0,17	0,89	0,62	0,34	0,78	0,90	0,92	0,31	0,97	0,69	0,65	0,77	0,80

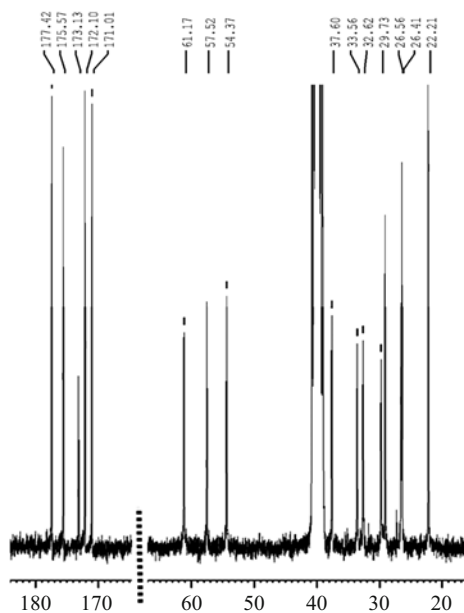


Рис. 4.  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектр ГСБ-106 ( $\text{DMSO-d}_6$ ).

лучшее разделение всех исследуемых соединений, чем на пластинках с алюминиевой подложкой.

На первом этапе соединения **1** – **12** были хроматографированы индивидуально в различных системах растворителей (табл. 1). Анализ полученных данных показал, что в одномерной ТСХ разделение не будет успешным вследствие близких показателей  $R_f$  (в основном для защищенных бис-пептидов **8**, **10**, **12**). Удовлетворительного разделения удалось достичь только с помощью двумерной ТСХ. Были подобраны следующие условия: элюент 1 — система бензол — метанол (1:4), элюент 2 — гексан — этилацетат (1:5). ГСБ-106 в этих условиях имеет  $R_f = 0$ .

Хроматограмма модельной смеси представлена на рис. 5, показатели хроматографической подвижности — в табл. 2.

На хроматографическую пластину наносили раствор ГСБ-106 в воде и растворы примесей **1** – **12** в метаноле. Обнаружение зон адсорбции соединений на

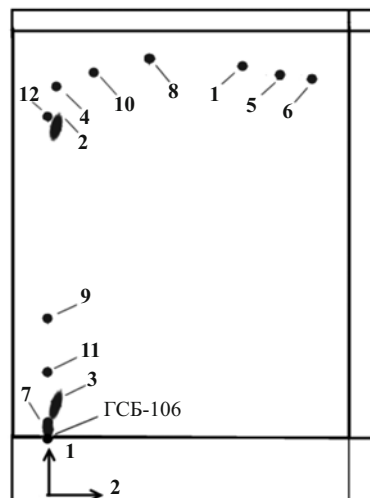


Рис. 5. Хроматограмма модельной смеси ГСБ-106 и технологических примесей **1** – **12**. Элюент 1 — система бензол — метанол (1:4), элюент 2 — система гексан — этилацетат (1:5).

пластинке проводили в УФ-свете с длиной волны 254 нм, пластинки обрабатывали спиртовым раствором нингидрина и хлортолидиновым реактивом.

Пределы обнаружения ГСБ-106 и технологических примесей составляли от 0,05 до 10 мкг (табл. 2). Следует отметить, что пределы обнаружения примесей при обработке хлортолидиновым реактивом значительно ниже в сравнении с другими индикаторами и составляют 0,05 – 0,5 мкг, поэтому этот способ обнаружения был выбран основным для дальнейших исследований.

При нанесении на хроматографическую пластинку 100 – 250 мкг серийных образцов субстанции ГСБ-106 ни в одном из них примесей **1** – **12** не обнаружено.

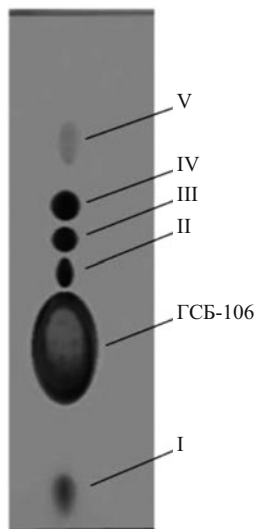
В то же время в серийных образцах был обнаружен ряд неидентифицированных примесей **I** – **V**. Оптимальное разделение этих примесей наблюдалось в системе Л значения  $R_f$  для примесей **I** – **V** составили соответственно 0,05, 0,62, 0,70, 0,74, 0,81 в системе (рис. 6).

Таблица 2

Значение  $R_f$  и предел обнаружения ГСБ-106 и его технологических примесей методом ТСХ

Соединение	$R_f$		Предел обнаружения, мкг		
	система Е	система В	УФ, 254 нм	нингидрин	хлортолидиновый реактив
ГСБ-106	0	0	–	0,5	0,5
<b>1</b>	0,91	0,64	–	–	0,05
<b>2</b>	0,78	0,04	0,5	–	0,5
<b>3</b>	0,10	0,04	–	0,5	0,5
<b>4</b>	0,86	0,03	10	–	0,5
<b>5</b>	0,89	0,77	10	–	0,5
<b>6</b>	0,88	0,88	10	–	0,5
<b>7</b>	0,03	0	–	0,5	0,5
<b>8</b>	0,93	0,33	10	–	0,5
<b>9</b>	0,29	0	–	10	0,5
<b>10</b>	0,90	0,14	10	–	0,5
<b>11</b>	0,16	0	–	10	0,5
<b>12</b>	0,79	0	–	–	0,5





**Рис. 6.** Хроматограмма образца субстанции ГСБ-106 в системе хлороформ — метанол — ледяная уксусная кислота — вода (15:10:2:3), объем нанесения — 200 мкг, проявление хлортолидиновым реактивом.

Для дополнительного подтверждения отсутствия примесей **8–12** и наличия неидентифицированных примесей в субстанции ГСБ-106 была разработана методика с использованием ВЭЖХ.

В результате исследований по выбору условий хроматографирования были подобраны следующие условия разделения: подвижная фаза А — смесь дистиллированной воды, ацетонитрила (для ВЭЖХ) и ТФУ (о.с.ч.) (0,05 % раствор ТФУ в 50 мл воды и 950 мл ацетонитрила); подвижная фаза Б — 0,05 % раствор ТФУ в ацетонитриле (для ВЭЖХ). Режим элюирования градиентный (0–30 %, от А к Б, 20 мин). Скорость потока 0,9 мл/мин, детектирование при длине волны 220 нм. Длина волны была выбрана на основании совпадения областей поглощения всех исследуемых соединений на УФ-спектрах в растворах в подвижной фазе Б.

В указанных условиях время удерживания исследуемых соединений составляло: ГСБ-106 — 6,3 мин, **9** — 12,9 мин, **12** — 14,5 мин, **11** — 18,5 мин, **10** — 21,6 мин, **8** — 24,7 мин. Относительное время удерживания **9** равно  $(2,05 \pm 0,02)$  мин, **12** —  $(2,30 \pm 0,02)$  мин, **11** —  $(2,94 \pm 0,03)$  мин, **10** —  $(3,43 \pm 0,03)$  мин, **8** —  $(3,92 \pm 0,04)$  мин. Предел обнаружения ГСБ-106 составлял  $4 \cdot 10^{-5}$  мкг, примесей — около  $5 \cdot 10^{-6}$  мкг.

Хроматограмма модельной смеси ГСБ-106 (концентрация 1 мг/мл) и промежуточных продуктов синтеза

**8–12** (концентрация 0,01 мг/мл каждой примеси) представлена на рис. 7.

Линейная зависимость площади пика от концентрации растворов ГСБ-106 наблюдалась в пределах интервала от 0,002 до 0,5 мг/мл, примесей — от 0,05 до 0,5 мг/мл.

Для определения посторонних примесей в образцах субстанции ГСБ-106 готовили растворы в подвижной фазе А с концентрацией 1 мг/мл. Содержание посторонних примесей определяли методом внешнего стандарта (концентрация раствора рабочего стандартного образца (РСО) — 0,005 мг/мл).

Проведение анализа: 0,010 г (точная навеска) препарата помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяли в достаточном объеме подвижной фазы А, доводили объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивали (испытуемый раствор).

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 0,005 г (точная навеска) РСО ГСБ-106, растворяли в достаточном объеме подвижной фазы А, доводили объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивали (раствор 1). В колбу вместимостью 10 мл помещали 1 мл полученного раствора 1, добавляли достаточное количество подвижной фазы А, перемешивали и доводили тем же растворителем до метки (раствор 2).

По 20 мкл испытуемого раствора и раствора 2 хроматографировали в описанных выше условиях. Хроматографирование испытуемого раствора проводили не менее 5 раз.

Содержание индивидуальной примеси в процентах оценивали по методу внешнего стандарта относительно площади пика РСО.

Пригодность хроматографической системы проверяли при определении фактора асимметрии пика ГСБ-106, эффективности хроматографической колонки и разрешению пиков ГСБ-106 и примеси **9**. Фактор асимметрии пика ГСБ-106 не превышал 1,20 и фактически составлял от 1,05 до 1,20. Эффективность хроматографической колонки оценивали по числу теоретических тарелок для пика ГСБ-106, которое находилось в интервале значений 6155–6734, было предложено считать систему пригодной, если число теоретических тарелок составляет не менее 6000. Разрешение пиков ГСБ-106 и примеси **9** составляло от 18,0 до 20,7.

С помощью метода ВЭЖХ по разработанной методике в образцах субстанции был обнаружен ряд примесей, до 7 индивидуальных примесей в каждом от-

Таблица 3

**Результаты определения посторонних примесей в образцах субстанции ГСБ-106 методом ВЭЖХ**

Опыт	Относительное время удерживания* и содержание примесей, %							Суммарное содержание примесей, %
	0,57	0,91	1,10	1,14	1,21	1,36	1,44	
1	0,27	0,15	0,50	0,32	0,23	0,41	0,32	2,20
2	0,27	0,50	0,50	0,40	0,44	0,42	0,47	3,00
3	0,33	—	0,47	0,28	0,50	0,48	0,29	2,35

\* Относительно времени удерживания ГСБ-106.

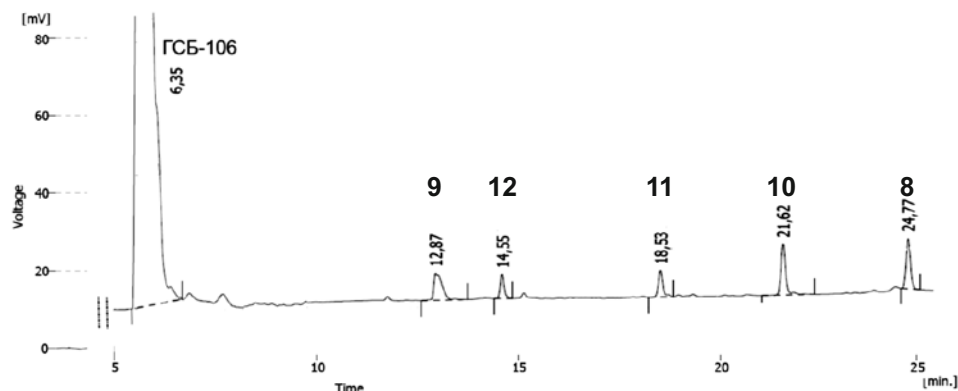


Рис. 7. Хроматограмма модельной смеси ГСБ-106 (1 мг/мл) и примесей 8 – 12 (по 0,01 мг/мл).

дельном образце (табл. 3). Подтверждено отсутствие в образцах примесей 8 – 12, остальные обнаруженные примеси идентифицировать не удалось, однако данные об их содержании коррелируют с данными, полученными методом ТСХ.

Содержание единичной примеси во всех образцах субстанции ГСБ-106 не превышало 0,5 %, суммарное содержание примесей составляло не более 4 %.

Разработанные методики ТСХ и ВЭЖХ выбраны нами для определения чистоты субстанции ГСБ-106.

Нами было проведено определение содержания воды в образцах субстанции ГСБ-106 методом К. Фишера, которое составило от 4,43 до 4,90 % (табл. 4).

Содержание остаточных органических растворителей в субстанции было определено методом ГЖХ. Исходя из технологии синтеза ГСБ-106 в образцах субстанции в качестве остаточных растворителей могут содержаться уксусная кислота и пиридин.

Анализ был проведен в следующих условиях: кварцевая капиллярная колонка HP-FFAP (“Agilent Technologies”, США) длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм, толщиной фазы 0,25 мкм, газ-носитель — гелий, скорость потока газа-носителя через колонку — 1,2 мл/мин. Температура испарителя поддерживалась равной 140 °С. Режим программирования температуры термостата колонки: 60 °С — 2 мин, от 60 до 210 °С нагревали со скоростью 20 °С/мин и выдерживали 2 мин при конечной температуре. Общее время анализа — 14,5 мин. Ввод пробы осуществляли в режиме с делением потока (split) 1:5. Объем вводимой парогазовой фазы составлял 500 мкл. Температура равновесия составляла 80 °С, время установления равновесия — 6 мин, температура проточной линии — 85 °С, время нагнетания — 5 с. Температура квадрупо-

ля — 150 °С, температура источника ионов — 230 °С. Использовалась ионизация электронным ударом при 70 эВ в режиме сканирования полного ионного потока (SCAN) в диапазоне от 10 до 100 *m/z*.

#### Эталонные стандартные растворы остаточных растворителей.

Класса 2: пиридин — 1 мг/мл в диметилсульфоксиде,

Класса 3: уксусная кислота — 25 мг/мл в воде.

**Приготовление исходного стандартного раствора смеси остаточных растворителей.** В пустой флакон объемом 10 мл переносили 100 мкл каждого эталонного стандартного раствора, доводили объем до 10 мл водой, закрывали и перемешивали.

**Приготовление рабочих стандартных растворов смеси остаточных растворителей.** Переносили в пустой флакон объемом 20 мл 1 мл исходного стандартного раствора смеси остаточных растворителей и добавляли 5 мл воды, герметично закупоривали, перемешивали и хроматографировали.

**Приготовление испытуемого раствора.** Переносили в пустой флакон объемом 20 мл 50 мг субстанции анализируемого образца, доводили объем до 6 мл водой, герметично закупоривали, перемешивали и хроматографировали.

В указанных условиях время удерживания пиридина и уксусной кислоты составило 4,24 и 6,20 мин соответственно (рис. 8).

Вычисление содержания пиридина и уксусной кислоты в образцах проводили из соотношения площади соответствующего пика в испытуемом растворе к площади пика в рабочих стандартных растворах.

Таблица 4

#### Содержание ГСБ-106 в образцах субстанции

Содержание	Номер серии		
	1	2	3
Результат количественного определения ГСБ-106 без учета содержания воды и остаточных растворителей, %	85,70	86,60	86,10
Воды, %	4,90	4,62	4,43
Уксусной кислоты, %	5,84	5,68	5,84
<b>ГСБ-106</b>	<b>96,01</b>	<b>96,34</b>	<b>96,15</b>

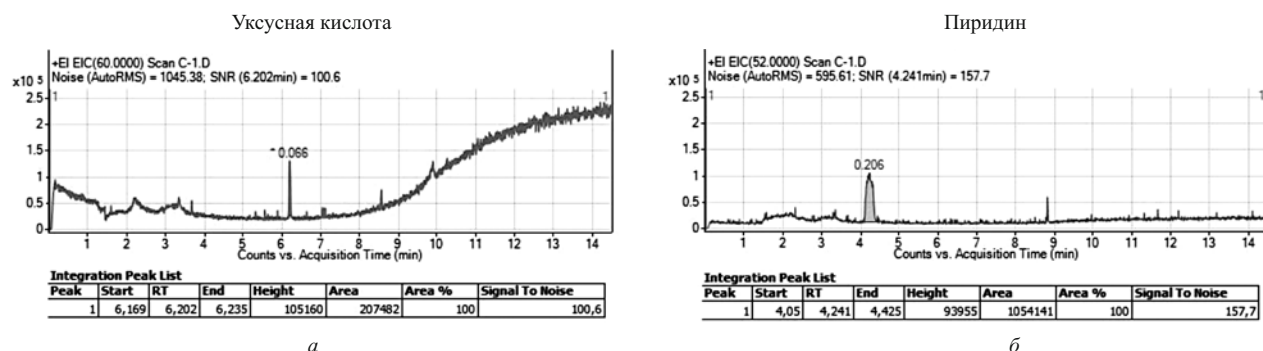


Рис. 8. Хроматограммы остаточных растворителей — пиридина (а) и уксусной кислоты (б).

Содержание уксусной кислоты в образцах составило от 5,68 до 5,84 % (табл. 4), содержание пиридина во всех образцах составляло менее 0,01 %.

Количественное определение субстанции ГСБ-106 проведено методом определения общего азота по Кьельдалю.

В результате исследований по выбору условий минерализации образцов ГСБ-106 были выбраны следующие условия проведения анализа: около 0,3 г (точная навеска) препарата помещали в пробирку вместимостью 250 мл, прибавляли 1,0 г растертой смеси калия сульфата и меди сульфата (10:1), 0,05 г металлического селена и 7 мл концентрированной серной кислоты. Содержимое пробирки нагревали около 60 мин при температуре 400 °С до получения светло-зеленого раствора (конец минерализации). После охлаждения в пробирку осторожно приливали при перемешивании 20 мл воды, снова охлаждали и присоединяли пробирку к прибору для перегонки с водяным паром.

В приемник перед началом отгонки наливали 20 мл 4 % раствора борной кислоты и прибавляли 5 капель смешанного индикатора.

Генерацию пара, нагрев пробирки и прибавление в пробирку 40 мл 30 % раствора натрия гидроксида проводили на приборе автоматически.

В сборник собирали около 200 мл отгона, дополнительно промывали систему водой дистиллированной. Отгон титровали 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты до перехода окраски смешанного индикатора

из зеленой в красно-фиолетовую. Параллельно проводили контрольный опыт. Раствор 0,1 М кислоты хлористоводородной в объеме 1 мл соответствует 0,001401 г азота.

При расчете количественного содержания ГСБ-106 в субстанции учитывали содержание в образцах субстанции воды и остаточных растворителей (уксусной кислоты). Результаты количественного определения ГСБ-106 — от 96,01 до 96,34 % (табл. 4).

Таким образом, нами изучены физико-химические характеристики, хроматографическая подвижность, определены основные фармакопейные показатели качества, разработаны экспериментально обоснованные методики определения подлинности и чистоты, а также количественного определения субстанции оригинального антидепрессанта ГСБ-106. Разработанные методики могут быть использованы для контроля качества субстанции ГСБ-106.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Патент РФ 2410392 (2011); *Бюл. изобрет.*, № 3 (2011).
2. Т. А. Гудашева, А. В. Тарасюк, И. О. Логвинов и др., *Биоорганич. химия*, **38**(3), 280 – 290 (2012).
3. А. В. Тарасюк, С. В. Помогайбо, Д. В. Курилов, Т. А. Гудашева., *Хим.-фарм. журн.*, **47**(1), 1 – 28 (2013).
4. Т. А. Гудашева, И. О. Логвинов, Т. А. Антипова, С. Б. Середин, *Докл. Академии наук*, **451**(5), 577 – 580 (2013).
5. С. Б. Середин, Т. А. Воронина, Т. А. Гудашева и др., *Acta Naturae*, **5**(4), 116 – 120 (2013).

Поступила 25.04.18

## STUDYING PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND DEVELOPING METHODS FOR THE ANALYSIS OF NEW ANTIDEPRESSANT AGENT GSB-106

A. V. Tarasyuk\*, N. M. Sazonova, A. N. Shumskii, A. L. Nekrashevich, P. I. Antipov, L. M. Gaevaya, L. N. Grushevskaya, and S. V. Minaev

Zakusov State Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 125315 Russia

\*e-mail: tarasiuk86@gmail.com

Dimeric dipeptide mimetic of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) 4th loop beta-turn GSB-106 (hexamethylenediamide bis-(N-monosuccinyl-L-seryl-L-lysine)) was designed in the Zakusov Institute of Pharmacology. Currently, GSB-106 is developed as an antidepressant with BDNF-ergic mechanism of action. In this work, the physicochemical properties of GSB-106 were studied and a method for analysis of the parent substance was developed. General pharmacopoeial quality characteristics have been determined, and the IR and NMR spectra of the parent substance were obtained. A method for determining impurities in the substance by TLC and HPLC techniques has been developed.

**Keywords:** GSB-106; BDNF mimetic; pharmaceutical analysis; HPLC; TLC; IR spectroscopy.