



## РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ И УСТАНОВЛЕНИЕ ПРОФИЛЯ ПРИМЕСЕЙ ДЛЯ 5-(5-ТРИФТОРМЕТИЛ-ИЗОКСАЗОЛ-3-ИЛ)ФУРАН-2-СУЛЬФОНАМИДА – ЛЕКАРСТВЕННОГО КАНДИДАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЛАУКОМЫ

**С. А. Ивановский, И. И. Яичков, А. А. Шетнев, М. К. Корсаков**

Сергей Александрович Ивановский, канд. хим. наук, доцент, Илья Игоревич Яичков, канд. фарм. наук, научный сотрудник, Антон Андреевич Шетнев, канд. хим. наук, доцент, Михаил Константинович Корсаков, д-р хим. наук, профессор

Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского, Ярославль, Россия  
s.ivanovskiy@yspu.org

**Ключевые слова:**  
карбоангидраза,  
глаукома, контроль  
качества, профиль  
примесей,  
высокоэффективная  
жидкостная  
хроматография

**Аннотация.** Глаукома является ведущей причиной необратимой слепоты. Ранняя диагностика и эффективное лечение способны замедлить прогрессирование заболевания и предотвратить необратимый распад зрительных функций. Известно, что изоформа карбоангидразы человека II является классической мишенью для лечения глаукомы. Нами была предложена молекула соединения 5-(5-трифторметил-изоксазол-3-ил)фуран-2-сульфонамида под проектным названием В016, которая показала высокую активность в тестах *in vitro* в качестве ингибитора карбоангидразы человека II. В настоящее время наш коллектив проводит разработку и доклинические исследования лекарственного препарата в форме глазных капель на основе данного соединения. Одним из этапов фармацевтических исследований является разработка методов контроля качества, как фармацевтической субстанции, так и готовой лекарственной формы. В ходе работ нами была разработана методика хроматографического разделения, которую можно использовать для контроля качества активной фармацевтической субстанции по показателям количественного определения. Так же был установлен профиль примесей, то есть установлена структура примесей, обнаруженных в продукте реакции получения соединения В016.

### Для цитирования:

Ивановский С.А., Яичков И.И., Шетнев А.А., Корсаков М.К. Разработка методики хроматографического разделения и установление профиля примесей для 5-(5-трифторметил-изоксазол-3-ил)фуран-2-сульфонамида – лекарственного кандидата для лечения глаукомы // *От химии к технологии шаг за шагом*. 2023. Т. 4, вып. 4. С. 60-67. URL: <http://chemintech.ru/index.php/tor/2023-4-4>

### Введение

Глаукома является ведущей причиной необратимой слепоты, причем ожидается повышение количества больных с 76,0 млн человек в 2020 г. до 111,8 млн в 2040 г. Ранняя диагностика и эффективное лечение способны замедлить прогрессирование заболевания и предотвратить необратимый распад зрительных функций [1].



Известно, что изоформа карбоангидразы человека II (КАЧ II) является классической мишенью для лечения глаукомы [2-5].

В продолжение наших работ по созданию новых сульфонамидов [6-8] нами был предложен лекарственный кандидат на основе молекулы 5-(5-трифторметил-изоксазол-3-ил)фуран-2-сульфонамида под проектным названием В016, который показал высокую активность в тестах *in vitro* в качестве ингибитора КАЧ II [9-11]. В настоящее время наш коллектив проводит разработку и доклинические исследования лекарственного препарата для лечения глаукомы в форме глазных капель.

Одним из этапов фармацевтических исследований является разработка методов контроля качества, как фармацевтической субстанции, так и готовой лекарственной формы. Основным методом, используемым в контроле качества лекарственных средств, является хроматография. Поэтому разработка хроматографической методики, позволяющей разделить целевой продукт и все потенциально возможные примеси, является актуальной задачей. Не менее важной задачей является установление структуры примесей, обнаруженных при анализе образцов субстанции. Это позволяет оценить потенциальные токсические эффекты примесей, производить и аттестовывать стандартные образцы примесей, которые потом могут быть использованы в рутинном контроле качества как фармацевтической субстанции, так и готовой лекарственной формы.

### Основная часть

Химический путь синтеза вещества В016 представлен на схеме рис. 1.

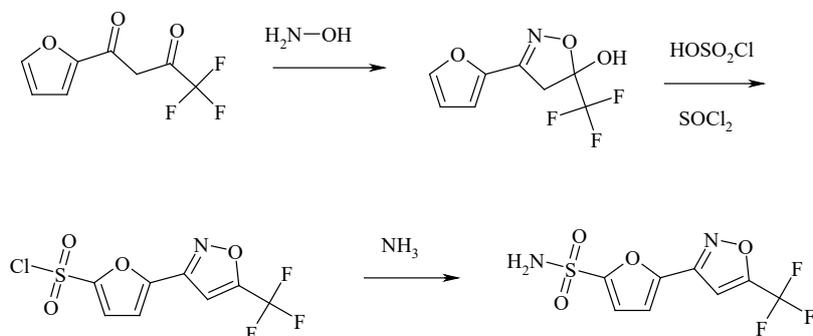


Рис. 1. Путь синтеза В016

Для разработки методики хроматографического разделения был использован образец, полученный на последней стадии без дополнительной очистки.

Для хроматографического разделения веществ, содержащихся в этом образце, нами была предложена методика, основные параметры которой приведены в экспериментальной части. Типичная хроматограмма приведена на рис. 2. Данная методика позволяет обеспечить приемлемые параметры разделения компонентов (разрешение между критическими пиками 3,25 и 2,99 соответственно).

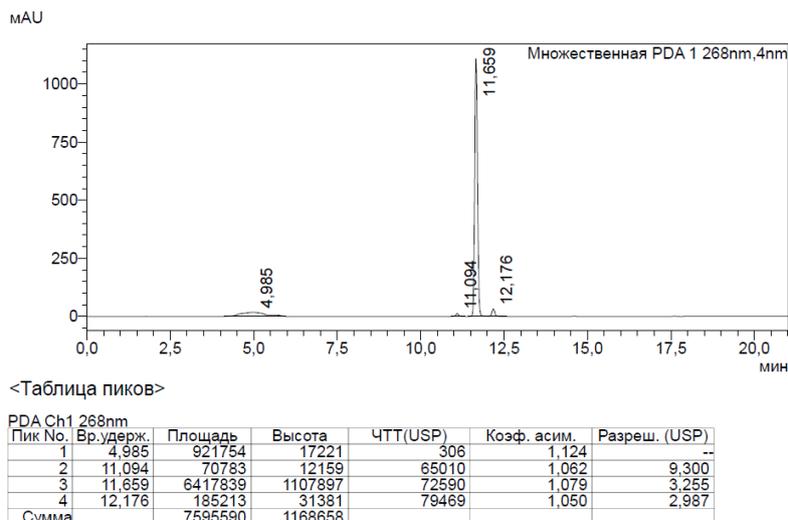


Рис. 2. Типичная хроматограмма продуктов реакции получения B016

Как видно из приведенной хроматограммы, кроме пика основного вещества присутствуют три дополнительных пика с временами удерживания соответственно 4,99 мин, 11,09 мин и 12,18 мин. Обозначим эти примеси соответственно как примесь А, примесь В и примесь С.

Для установления структуры примесей нами был использован метод LC/MS/MS.

На рис. 3. представлен масс-спектр примеси А на квадруполе Q1 и масс-спектр распада родительского молекулярного иона на квадруполе Q3.

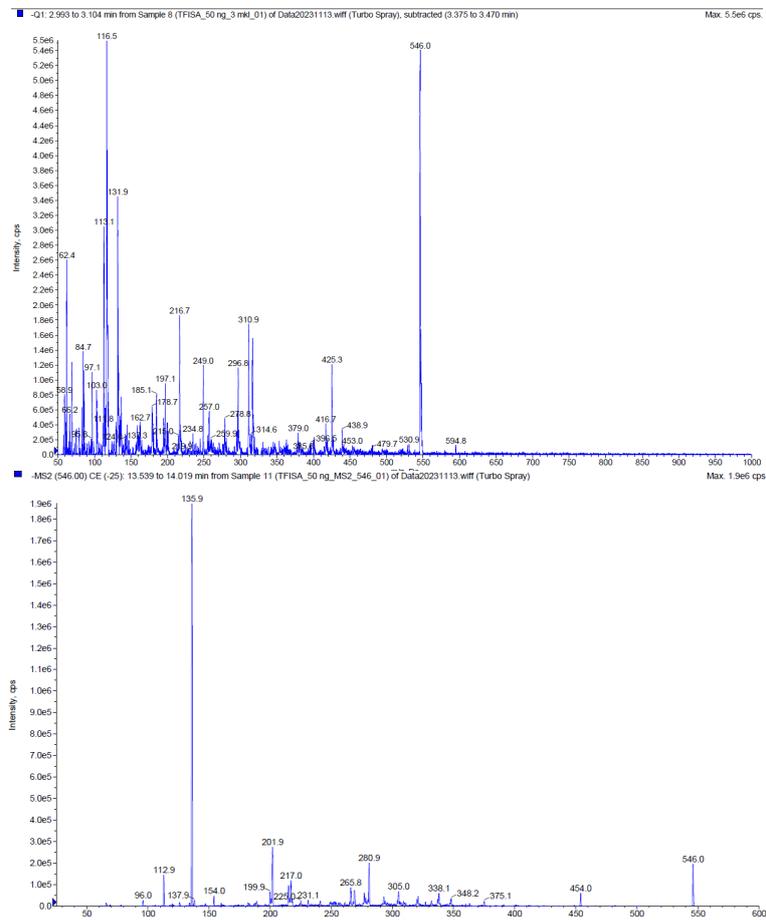


Рис. 3. Масс-спектры примеси А



Основной молекулярный ион  $M/Z = 546$  соответствует структуре димера (см. рис. 3). Структуры молекулярных ионов, образующихся при распаде родительского иона, также представлены на рис. 4

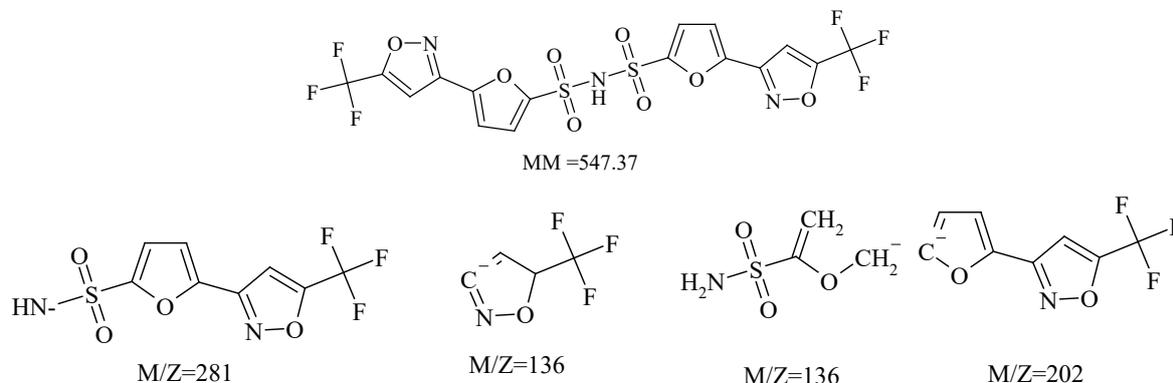


Рис. 4. Структура примеси А и структуры осколков, соответствующих пикам масс-спектра на Q3

Таким образом можно сделать вывод, что примесь А – это димер.

Примеси В и С по своим физико-химическим свойствам близки к основному веществу. Логично предположить, что это производные изомеров, образующихся при сульфохлорировании. И именно эти соединения (примесь В, В016 и примесь С) являются критическими парами при хроматографическом разделении смеси.

На рис. 5. представлен масс-спектр примеси В на квадруполе Q1 и масс-спектр распада родительского молекулярного иона на квадруполе Q3.

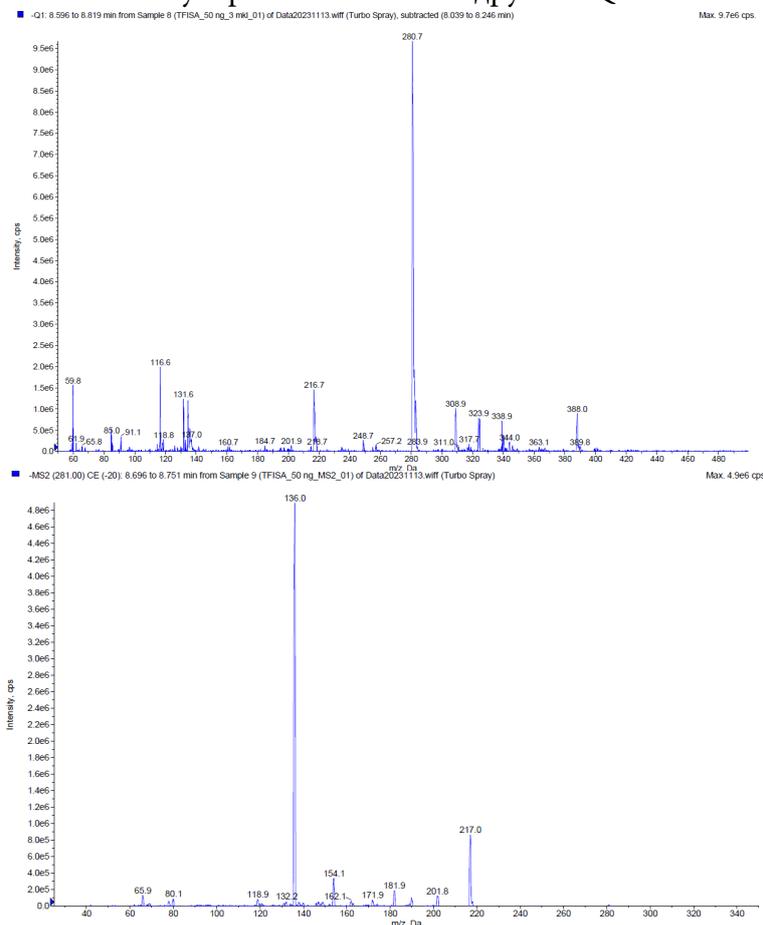


Рис. 5. Масс-спектры примеси В



Основной молекулярный ион  $M/Z = 281$  соответствует структуре 2-(5-трифторметил-изоксазол-3-ил)фуран-3-сульфонамида (рис. 6). Структуры молекулярных ионов, образующихся при распаде родительского иона, также представлены на рис. 6

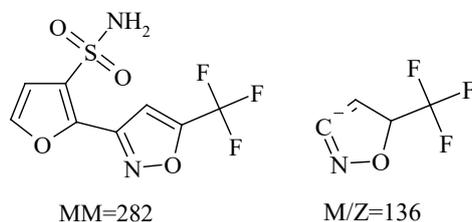


Рис. 6. Структура примеси В и структуры осколков, соответствующих пикам масс-спектра на Q3

Таким образом можно сделать вывод, что примесь В – это 2-(5-трифторметил-изоксазол-3-ил)фуран-3-сульфонамид.

На рис. 7 представлен масс-спектр примеси С на квадруполе Q1 и масс-спектр распада родительского молекулярного иона на квадруполе Q3.

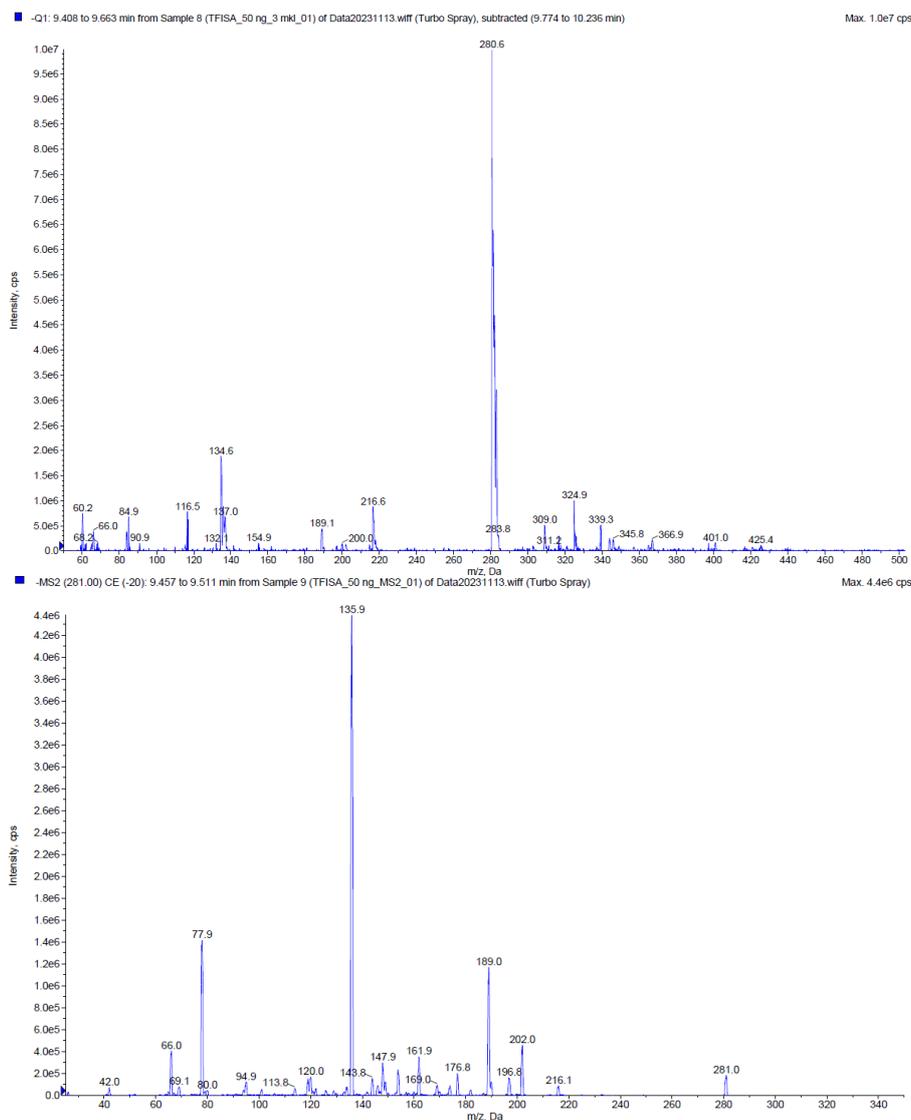


Рис. 7. Масс-спектры примеси С



Основной молекулярный ион  $M/Z = 281$  соответствует структуре 5-(5-трифторметил-изоксазол-3-ил)фуран-3-сульфонамида (рис. 8). Структуры молекулярных ионов, образующихся при распаде родительского иона, также представлены на рис. 8

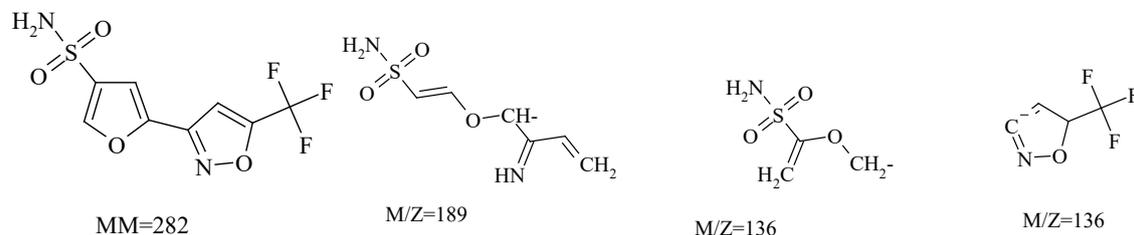


Рис. 8. Структура примеси С и структуры осколков, соответствующих пикам масс-спектра на Q3

Таким образом, можно сделать вывод, что примесь С – это 5-(5-трифторметил-изоксазол-3-ил)фуран-3-сульфонамид.

### Экспериментальная часть

Реагенты и растворители («Aldrich», «Acros») являются коммерчески доступными и были использованы без предварительной очистки.

Хроматограммы получены на хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence.

Модельная смесь для хроматографии и образцы ЛС В016 получены по методике [5].

Методика проведения анализа ЛС В016. Растворитель: в коническую колбу с притертой пробкой помещают 140 мл ацетонитрила и 60 мл воды, раствор перемешивают, фильтруют и дегазируют.

Испытуемый раствор. Около 0,01 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 5 мл, растворяют в 3 мл растворителя, доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают.

1 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр с размером пор не более 0,45 мкм.

Хроматографические условия (табл. 1):

Колонка	Kinetex C18 5мкм 250x4,6мм или аналогичная;
Подвижная фаза А	вода деионизированная;
Подвижная фаза В	ацетонитрил;
Скорость потока	1,5 мл/мин;
Температура колонки	25 °С;
Детектор	спектрофотометрический, длина волны 268 нм;
Объем пробы	10 мкл

Таблица 1. Градиентная программа элюирования

Время, мин	Подвижная фаза А, %	Подвижная фаза В, %
0	70	30
3	70	30
20	45	55
21	70	30



Идентификацию продуктов реакции проводили с помощью ВЭЖХ-МС/МС-системы, включающей в себя тандемный масс-спектрометрический детектор AB Sciex QTRAP5500 (AB Sciex LLC, США) и хроматограф Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies LLC, США), состоящий из насоса G1312B, автосемплера G1329B с термостатом G1330B, термостата колонок G1316A (управление прибором - программное обеспечение «Analyst 1.6.2» (AB Sciex LLC, США), обработка хроматограмм – программное обеспечение «MultiQuant 3.0.5» (AB Sciex LLC, США), прогнозирование метаболитов и создание MRM-методов идентификации метаболитов – программное обеспечение «LightSight» 2.3 (AB Sciex LLC, США)).

**Таблица 2.** Параметры масс-спектрометрического детектирования V016 и его метаболитов

Параметры	Значение
Способ ионизации	Электрораспылительная ионизация (ESI)
Напряжение электроспрея	+5500 В
Газовая завеса	30 psi (Азот)
CAD-газ (диссоциация, активированная соударением)	High (Азот)
Температура источника ионов	700 °C
Газ 1 (Нагревающий газ)	55 psi (Воздух)
Газ 2 (Газ-небулайзер)	55 psi (Воздух)

### Выводы и рекомендации

Была разработана методика хроматографического разделения, которую можно использовать для контроля качества активной фармацевтической субстанции по показателям количественное определение и родственные примеси. Данная методика позволяет обеспечить приемлемые параметры разделения критических компонентов (разрешение между пиками примеси В и V016 и пиками V016 и примеси С 3,25 и 2,99 соответственно).

С помощью метода LC/MS/MS был установлен профиль примесей, то есть установлена структура примесей, обнаруженных в продукте реакции получения соединения V016.

*Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства просвещения Российской Федерации № 073-00077-21-02 на выполнение научных исследований по теме «Разработка инновационного лекарственного средства для лечения открытоугольной глаукомы путем селективного ингибирования карбоангидразы II» (№ реестровой записи 730000Ф.99.1. БВ10АА00006).*

### Список источников

1. Schellack N., Schellack, G., Bezuidenhout, S. Glaucoma: A brief review // *SA Pharmaceutical Journal*. 2015. Vol. 82. P. 18-22. DOI: 10520/EJC174862.
2. Курышева Н.И. Ингибиторы карбоангидразы в лечении глаукомы. Обзор. Часть 1 // *Офтальмология*. 2020. Т. 17, № 3. С. 542-549. DOI: 10.18008/1816-5095-2020-3S-542-549.
3. Курышева Н.И. Ингибиторы карбоангидразы в лечении глаукомы. Обзор. Часть 2 // *Офтальмология*. 2020. Т.17, № 4. С. 676-682. DOI: 10.18008/1816-5095-2020-4-676-682.



4. **Scozzafava A., Mastrolorenzo C.T.** Supuran. Carbonic anhydrase inhibitors and activators and their use in therapy // *Expert Opin. Ther.* 2006. Vol. 16. P. 1627-1664. DOI: 10.1517/13543776.16.12.1627.
5. **Крылов, Е.Н., Вирзум Л.В.** Квантово-химический анализ взаимодействия алкиларилсульфонамидов с  $\alpha$ -карбоангидразой h CA II // *Бутлеровские сообщения*. 2021. Т. 66, № 5. С. 11-23. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/21-66-5-11.
6. **Комшина Л.А., Мартазова В.В., Проскурина И.К., Корсаков М.К., Котов А.Д.** Синтез 3-арилизоксазолов и их сульфамидных производных // *Бутлеровские сообщения*. 2020. Т. 63, № 9. С. 10-18. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/20-63-9-10.
7. **Комшина Л.А., Васильева Е.А., Проскурина И.К., Котов А.Д., Корсаков М.К.** Региоселективность сульфониохлорирования 3-арил-5-N-ациламиноизоксазолов // *Бутлеровские сообщения*. 2021. Т. 67, № 8. С. 123-128. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/21-67-8-123
8. **Комшина Л.А., Васильева Е.А., Проскурина И.К., Блюмина М.В., Котов А.Д., Корсаков М.К.** Региоселективность сульфониохлорирования 1-арил-6-пиразол-1-ил-пиридазинов // *Бутлеровские сообщения*. 2022. Т. 69, № 2. С. 15-21. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/22-69-2-15
9. **Krasavin M., Korsakov M., Dorogov M., Tuccinardi T., Dedeoglu N., Supuran C.T.** Probing the «bipolar» nature of the carbonic anhydrase active site: Aromatic sulfonamides containing 1,3-oxazol-5-yl moiety as picomolar inhibitors of cytosolic CA I and CA II isoforms // *Eur. J. Med. Chem.* 2015. Vol. 101. P. 334-347. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.06.022
10. **Krasavin M., Korsakov M., Zvonaryova Z., Semyonychev E., Tuccinardi T., Kalinin S., Supuran C.T.** Human carbonic anhydrase inhibitory profile of mono- and bis-sulfonamides synthesized via a direct sulfochlorination of 3- and 4-(hetero)arylisoxazol-5-amine scaffolds // *Bioorg. Med. Chem.* 2017. Vol. 25, no. 6. P. 1914-1925. DOI: 10.1016/j.bmc.2017.02.018.
11. Патент № 2607630 РФ. Ароматические производные сульфаниламидов ингибиторы карбоангидразы II (CA II), способы их получения и применения / **М.В. Дорогов, М.Ю. Красавин**. Опубл. 2017.

Поступила в редакцию 01.11.2023

Одобрена после рецензирования 15.11.2023

Принята к опубликованию 21.11.2023