

Определение энантиомерной чистоты пеметрекседа на сорбентах с иммобилизованными макроциклическими антибиотиками

**Е.Н. Шаповалова, И.А. Федорова, А.А. Припорова,
И.А. Ананьева*, О.А. Шпигун**

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,
Российская Федерация, 119991, г. Москва, Ленинские горы, 1-3*

*Адрес для переписки: Ананьева Ирина Алексеевна, E-mail: irishan@mail.ru

Поступила в редакцию 5 марта 2016 г., после исправления – 1 апреля 2016 г.

Исследовано энантиоразделение пеметрекседа на сорбентах с иммобилизованными на поверхности силикагеля макроциклическими гликопептидными антибиотиками. Пеметрексед относится к фармакологической группе антиметаболитов, обладающих противоопухолевой активностью; структурный аналог фолиевой кислоты. Систематическое (ИЮПАК) наименование динатриевая соль (2S)-2-[[4-[2-(2-амино-4-оксо-4,7-дигидро-1H-пиррол[2,3-d]пиримидин-5-ил)этил]бензоил]-глутаминовой кислоты гептагидрат, действующее вещество – L-изомер пеметрекседа. Механизм противоопухолевого действия пеметрекседа обусловлен ингибированием синтеза пуринов и пиримидинов. Для того чтобы выявить как влияет структура антибиотика, взятого в качестве хирального селектора, на энантиоразделение веществ, для разделения энантиомеров использовали неподвижные фазы с отличающимися по своей структуре антибиотиками – эремомицином (коммерческая колонка Nautilus-E (ЗАО «Био-Хим-Мак», Россия)) и агликоном тейкопланина (ChirobioticTAG (Astec, США)). Разделение энантиомеров проводили в обращенно-фазовом и полярно-ионном режимах хроматографии. Для разделения энантиомеров в обращенно-фазовом режиме хроматографии в качестве подвижной фазы использовали смесь раствора дигидрофосфата аммония ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) и органических растворителей – метанол (MeOH), ацетонитрил (ACN), в полярно-ионном режиме – органические растворители (метанол, ацетонитрил) с добавками кислот (ледяная уксусная кислота и муравьиная кислота) и оснований (триэтиламин и диэтиламин). Исследовали влияние природы и концентрации компонентов подвижной фазы, ее состава и pH на разделение энантиомеров пеметрекседа на силикагеле, модифицированном эремомицином и агликоном тейкопланина. Энантиомеры пеметрекседа удалось разделить с разрешением 2.8-3.3 на колонке Nautilus-E в обращенно-фазовом режиме. Полярно-ионный режим хроматографии не дал положительных результатов, разделить энантиомеры не удалось: пеметрексед практически не удерживался на колонке (значение фактора удерживания $k' = 0.1 \div 0.3$) независимо от концентрации добавки кислоты и амина в подвижную фазу. Проведенные исследования энантиоразделения пеметрекседа на сорбенте с агликоном тейкопланина в обращенно-фазовом и полярно-ионном режимах хроматографии показали, что энантиомеры пеметрекседа невозможно разделить с данным селектором. Агликон тейкопланина содержит только одну аминокгруппу, по сравнению с тремя у эремомицина, что уменьшает электростатические взаимодействия между макроциклическим антибиотиком и пеметрекседом, и на сорбенте, модифицированном агликоном тейкопланина, он удерживается слабо. Эремомицин содержит значительно больше хиральных центров по сравнению с агликоном тейкопланина. Кроме того, лучшая селективность разделения энантиомеров реализуется за счет образования водородных связей и дипольных взаимодействий с амидными и гидроксильными группами эремомицина и за счет гидрофобных взаимодействий. Показана возможность определения энантиомерной чистоты фармацевтического препарата на колонке Nautilus-E при элюировании подвижной фазой: (55 : 15 : 30) % об. MeOH : ACN : $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (50 мМ, pH = 2.5), время анализа составляет меньше 10 минут, D-изомер не обнаружен. Предел обнаружения соединения, оцененный по отношению сигнал/фон = 3 : 1 составил 0.0003 мг/мл, что соответствует 0.12 % мас. D-формы по отношению к общему количеству препарата.

Ключевые слова: макроциклические гликопептидные антибиотики, хиральные селекторы, энантиомеры, оптическая чистота лекарственных форм.

Determination of the enantiomeric purity of Pemetrexed on the macrocyclic glycopeptides bonded phases

E.N. Shapovalova, I.A. Fedorova, A.A. Priporova, I.A. Ananieva, O.A. Shpigun

M.V. Lomonosov Moscow State University, 1-3 Leninskie gory, Moscow, , 119991, Russian Federation

*Corresponding author: *Irina A. Ananieva, E-mail: irishan@mail.ru*

Submitted 5 March 2016, received in revised form 01 April 2016

The enantioseparation of Pemetrexed on chiral sorbents with macrocyclic glycopeptide antibiotics as chiral selectors was investigated. The pharmacological group of Pemetrexed is antimetabolites with antitumor activity. Pemetrexed is a structural analog of folic acid. IUPAC name of this drug is disodium (2S)-2-[[4-[2-(2-amino-4-oxo-4,7-dihydro-1H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)ethyl]benzoyl]amino]pentanedioate heptahydrate. The mechanism of Pemetrexed antitumor action is based on the inhibition of the synthesis of purine and pyrimidine. Chiral stationary phases with antibiotics of different structures were used. Columns with silica modified antibiotic eremomycin (commercial column Nautilus-E, Bio-Chem-Mac, Russia) and silica with teicoplanin aglycone (Chirobiotic TAG, Astec, USA) were applied. The separation of the enantiomers was carried out by the reversed-phase and polar-ion chromatography modes. The mobile phase in the reversed-phase chromatography mode was a mixture of ammonium dihydrogenphosphate solution and organic solvents (methanol, acetonitrile), and in polar-ion mode – organic solvents (methanol, acetonitrile) with additives of acids (acetic acid, formic acid) and bases (triethylamine, diethylamine). The influence of the components' nature and concentration in the mobile phase, their composition and pH on the separation of Pemetrexed enantiomers was investigated using the silica modified eremomycin and teicoplanin aglycone. The resolution of Pemetrexed enantiomers was 2.8 - 3.3 in the reverse phase mode on the column with eremomycin. In the polar-ion mode chromatography, Pemetrexed eluted with dead volume (capacity factor $k' = 0.1 \div 0.3$) independently of the additives concentrations in the mobile phase. The enantiomers of Pemetrexed were not separated on the column with teicoplanin aglycone. Teicoplanin aglycone has one amino-group only, whereas eremomycin has three amino-groups. Electrostatic interactions between teicoplanin aglycone and Pemetrexed were less than interactions between eremomycin and Pemetrexed. Eremomycin has more chiral centers than teicoplanin aglycone. In addition, hydrophobic interactions, hydrogen bonds and dipolar interactions with amide and hydroxyl groups of eremomycin provide high enantioselectivity of sorbent with eremomycin. The determination of enantiomeric purity of Pemetrexed drug on the column with eremomycin was conducted. Mobile phase was (55:15:30) MeOH:ACN:NH₄H₂PO₄ (50mM, pH = 2.5). The time of analysis was less than 10 minutes. D-isomer was not detected in the drug. The limit of detection of Pemetrexed D-enantiomer was 0.0003 mg/ml (assumed 3:1 signal to noise ratio) which constituted 0.12 % from the total amount drug.

Keywords: macrocyclic glycopeptides, chiral selector, enantiomers, enantiomeric purity of the pharmaceutical substances.

ВВЕДЕНИЕ

Современные тенденции развития фармацевтической промышленности свидетельствуют о растущей потребности в получении оптически чистых лекарственных форм. Необходимость практического использования хиральных соединений в оптически чистой форме обусловлена различием в химических и биологических свойствах индивидуальных энантиомеров.

В настоящее время часть энантиомерно чистых лекарств производится с применением микробиологических методов синтеза, однако для получения многих соединений в форме одного оптического изомера такие методы либо неэффективны, либо вообще невозможны. Весьма эффективным является асимметрический синтез, но и этот метод не дает нужной степени чистоты энантиомерного продукта, так как для многих лекарственных препара-

тов энантиомерная чистота должна быть не ниже 99.5 % мас., а для отдельных лекарств и хиральных катализаторов – практически 100 % мас. [1]. Другой способ получения чистых оптических изомеров – разделение их смесей. Среди известных методов разделения наиболее целесообразным является метод хиральной хроматографии. Хроматографическое разделение энантиомеров принципиально возможно только в системах, содержащих хиральный селектор, способный различать их пространственную конфигурацию. В связи с этим интерес к изучению старых и получению новых хиральных селекторов постоянно растет.

Пеметрексед – препарат, который относится к фармакологической группе антиметаболитов, назначают при злокачественной мезотелиоме плевры, а также при немелкоклеточном раке лёгкого. Действующим веществом препарата является L-изомер

пеметрекседа (рис. 1), поэтому необходимо отделять от него D-изомер.

Известны два подхода для оценки энантио-селективности – разделение изомеров в нормально-фазовом режиме с использованием хиральной полисахаридной неподвижной фазы, в частности на основе амилозы [2], разделение на гидрофобной неподвижной фазе – октадецилсиликагеле с использованием в качестве хиральной добавки β-циклодекстрина в подвижную фазу [3].

Иммобилизованные на поверхность сорбента макроциклические гликопептидные антибиотики, к которым относятся ванкомицин, тейкопланин, ристоцетин А, авопарцин и др., успешно зарекомендовали себя в качестве хиральных селекторов в ВЭЖХ для энантиоразделения большого круга лекарственных препаратов [4, 5]. Высокая селективность разделения энантиомеров с селекторами этого класса обусловлена наличием в их структуре различных фрагментов, способных к многоточечным взаимодействиям с разделяемыми соединениями как в полярных, так и неполярных растворителях.

Целью данной работы являлось изучение влияния состава подвижной фазы на селективность разделения энантиомеров лекарственного препарата пеметрекседа на сорбентах, модифицированных антибиотиками (эремомоцином, агликоном тейкопланина), и выбор условий определения энантиомерной чистоты лекарственных субстанций.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. В качестве аналитов использовали стандартный образец L-энантиомера (Ph. Eur. Reference Standard), рацемическую смесь энантиомеров и субстанцию фармацевтического препарата пеметрекседа, предоставленные ЗАО «Ф-Синтез». Исходные растворы (0.1-1 мг/мл) пеметрекседа готовили растворением точных навесок в ацетонитриле, метаноле или воде.

Для приготовления подвижных фаз использовали следующие реагенты: ацетонитрил, метанол («для хроматографии», «Panreac», Испания); муравьиная кислота (85 % мас., «о.с.ч.», «Реахим», Россия), уксусная кислота (98 % мас., «о.с.ч.», «Реахим», Россия); диэтиламин, триэтиламин (99 % мас., «о.с.ч.», «Acros Organics», США).

Фосфатный буферный раствор готовили растворением точных навесок дигидрофосфата аммония («ч.д.а.», «Реахим», Россия) с последующим добавлением фосфорной кислоты до нужного значения pH.

Оборудование. В работе использовали жидкостной хроматограф LC-20 Prominence («Shimadzu», Япония) с диодно-матричным детектором SPD-M20A («Shimadzu», Япония). Сбор данных и обработку хроматограмм проводили с помощью программного обеспечения LC Solution фирмы «Shimadzu». Скорость подачи элюента составляла 1 мл/мин, объем петли дозатора 20 мкл, ввод пробы осуществляли

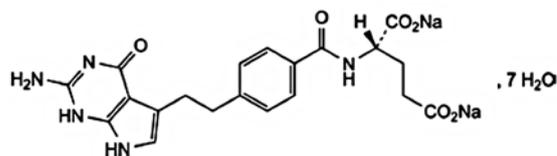


Рис. 1. Структурная формула пеметрекседа
Fig. 1. The structural formula of Pemetrexed

шприцем объемом 100 мкл; $\lambda_{max} = 230$ нм; коммерческие колонки: Nautilus-E (250 × 4 мм) (ЗАО «Био-Хим-Мак», Россия), диаметр зерна сорбента – 5 мкм, Chirobiotic TAG (250 × 4.6мм) (Supelco- Sigma-Aldrich, США), диаметр зерна сорбента – 5 мкм; pH водных растворов измеряли на pH-метре «pH-410» («Аквилон», Россия); перед использованием подвижную фазу дегазировали на ультразвуковой ванне «Сапфир 6580» (рабочая частота 35 кГц, мощность 60 Вт, НПФ «Сапфир», Россия) в течение 10 минут для снижения колебаний фонового сигнала и обеспечения нормальной работы насоса.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сорбент, модифицированный антибиотиком эремомоцином, разработан в России и еще не достаточно исследован [6, 7], в литературе отсутствуют сведения о разделении с помощью этого селектора энантиомеров пеметрекседа. Эту задачу пока не решали и с использованием в качестве хирального селектора других макроциклических антибиотиков. Интересно сравнить разделение энантиомеров пеметрекседа с антибиотиками различного строения – эремомоцином и агликоном тейкопланина (рис. 2 и 3).

Для разделения энантиомеров пеметрекседа использовали коммерческую колонку отечественного производства Nautilus-E. Разделение энантиомеров пеметрекседа проводили в полярно-ионном (ПИ) и обращено-фазовом (ОФ) режимах хроматографии. В ПИ режиме в качестве подвижной фазы использовали органические растворители (метанол, ацетонитрил) с добавками кислот (ледяная уксусная кислота и муравьиная кислота) и оснований (триэтиламин и диэтиламин). ПИ режим хромато-

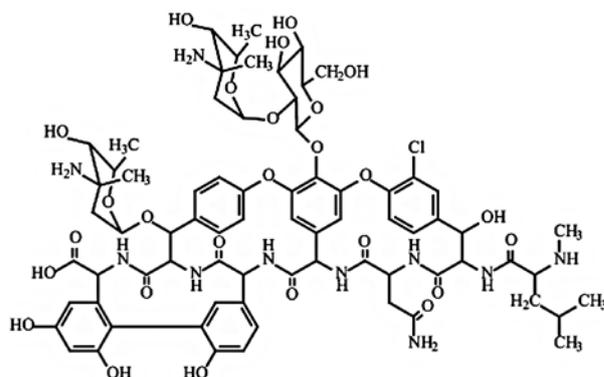


Рис. 2. Структурная формула антибиотика эремомоцина
Fig. 2. The structural formula of eremomycin

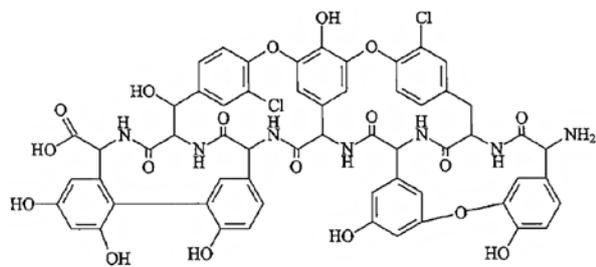


Рис. 3. Структурная формула агликона тейкопланина
Fig. 3. The structural formula of teicoplanin aglycone

графии не дал положительных результатов, разделить энантимеры пеметрекседа не удалось: вещество практически не удерживалось на колонке ($k' = 0.1 \div 0.3$) независимо от концентрации кислоты и амина в подвижной фазе.

Энантиоразделения данного препарата удалось добиться в ОФ режиме хроматографии. В качестве подвижной фазы использовали смесь дигидрофосфата аммония и органических растворителей (метанол, ацетонитрил).

В ОФ режиме исследовали влияние на энантиоразделение содержания метанола в составе подвижной фазы (табл. 1). Как видно из табл. 1, зависимость времени удерживания энантиомеров от содержания метанола проходит через минимум, который наблюдается при соотношении: (70 : 30) % об. метанол – 50 мМ раствор дигидрофосфата аммония (рис. 4). Из литературы известно, что для многих антибиотиков наблюдается такой характер зависимости [8]. Это связано с тем, что при содержании органического модификатора в подвижной фазе до 80 % об. реализуется истинно обращенно-фазовый вариант хроматографии. Разделение энантиомеров в ОФ режиме определяется, в основном, гидрофобными взаимодействиями и образованием водородных связей между сорбатом и макроциклическим антибиотиком. При большем содержании органического модификатора изменяется состав неподвижной фазы, происходит заполнение

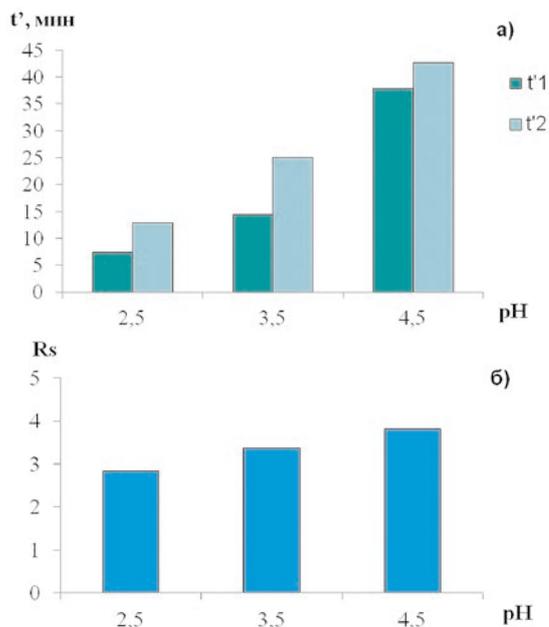


Рис. 4. Влияние pH подвижной фазы на: а – времена удерживания ($t'1$ – время удерживания L-изомера, $t'2$ – время удерживания D-изомера) и б – разрешение пиков энантиомеров пеметрекседа. Хроматографическая колонка: Nautilus-E, 250×4 мм. Подвижная фаза: (70 : 30) % об. MeOH : $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (50 мМ)

Fig. 4. Effect of mobile phase pH on a) the retention times ($t'1$ – retention time of L-isomer, $t'2$ – retention time of D-isomer) and b) resolution of the peaks of enantiomers of Pemetrexed. Column: Nautilus-E, 250×4 mm. Mobile phase: (70 : 30) vol. % MeOH : $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (50 mM)

им полостей хирального селектора. Хроматографическое поведение в этом случае определяется более сильными ионными взаимодействиями и образованием водородных связей. В случае с ионными соединениями (кислотой или основанием), большую роль играет близость и доступность функциональных групп вокруг хирального центра, усиливая ионные взаимодействия и, таким образом, управляя степенью селективности / разделения.

Таблица 1

Влияние содержания метанола в подвижной фазе на разделение D- и L-изомеров пеметрекседа (50 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, pH = 2.5)

Effect of the content of methanol in the mobile phase separation of D- and L-isomers Pemetrexed (50 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, pH = 2.5)

Содержание метанола, % об.	Исправленное время удерживания, мин		k'	α	R_s	N , тт/м, L	N , тт/м, D
	L	D					
40	15.6	30.2	7.4	1.94	3.3	4400	7200
50	9.6	18.2	4.6	1.90	3.0	6800	8700
60	8.5	15.9	4.1	1.87	2.9	5600	9600
70	7.4	12.9	3.5	1.74	2.8	7300	12400
80	10.0	16.1	4.8	1.61	2.7	4300	5400
90	18.1	28.9	8.6	1.60	2.7	4800	6400

Примечания: k' – фактор емкости для первого энантиомера, α – коэффициент селективности, R_s – разрешение (фактор разрешения).

Таблица 2

Влияние соотношения ацетонитрила и метанола в подвижной фазе на хроматографические параметры D- и L-изомеров пеметрекседа

Influence of ratio of acetonitrile and methanol in the mobile phase to the chromatographic parameters D- and L-isomers Pemetrexed

Соотношение ацетонитрил : метанол в подвижной фазе, об.%	<i>t'</i> , мин		<i>k'</i>	α	<i>Rs</i>	<i>N</i> , тт/м, L	<i>N</i> , тт/м, D
	L	D					
0 : 100	7.4	12.9	3.5	1.74	2.8	4300	3600
10 : 90	7.0	11.6	3.3	1.66	2.7	4800	3800
20 : 80	4.8	7.1	2.4	1.48	2.7	6000	4100
30 : 70	7.8	11.1	3.7	1.42	2.5	4600	3800
40 : 60	6.7	10.2	3.2	1.52	2.3	4400	3500
50 : 50	6.1	9.4	2.9	1.54	2.3	4500	3600
60 : 40	5.6	8.6	2.7	1.54	2.3	5000	4000
70 : 30	2.9	4.4	1.4	1.52	2.0	5300	4000
80 : 20	2.7	4.2	1.3	1.56	2.1	6000	4100
100 : 0	3.8	6.1	1.8	1.60	2.2	5300	4000

Разрешение пиков энантиомеров при увеличении содержания органического модификатора в подвижной фазе незначительно увеличивается и всегда больше 2.5, что достаточно для определения примеси одного энантиомера на фоне другого. Для повышения экспрессности анализа в дальнейшем использовали подвижную фазу, содержащую 70 % об. органического модификатора.

Из литературных данных [6, 7] известно, что энантиоселективность эремомицина выше при низких значениях pH, поэтому в качестве водного компонента подвижной фазы использовали раствор дигидрофосфата аммония с pH = 2.5-4.5. Влияние pH подвижной фазы на время удерживания оптических изомеров и их разделение показано на рис. 4.

При увеличении pH подвижной фазы от 2.5 до 4.5 увеличиваются время удерживания пиков и их разрешение, но при этом пики уширяются. Значительное влияние pH элюента на разделение энантиомеров обусловлено наличием ионизирующихся групп как у хирального селектора, так и у разделяемого вещества. В исследованном интервале pH эремомицин находится в форме катиона. С ростом pH уменьшается степень протонизации атомов азота увеличивается степень диссоциации карбоксильных групп в структуре пеметрекседа, что приводит к увеличению удерживания пеметрекседа за счет электростатических взаимодействий между карбоксильными группами пеметрекседа и аминогруппами эремомицина (рис. 4, а). Энантиоразделение реализуется также за счет образования водородных связей и дипольных взаимодействий с амидными и гидроксильными группами эремомицина и за счет гидрофобных взаимодействий.

Длительный анализ нецелесообразен для использования методики для контроля качества, поэтому при дальнейших исследованиях использовали буферные растворы с pH = 2.5, т.к. при этом приемлемое значение фактора разрешения (≈ 2.5) достигается меньше, чем за 15 минут.

Исследовали влияние природы органического растворителя подвижной фазы на параметры энантиоразделения пеметрекседа (табл. 2). При варьировании природы органического растворителя выявили, что частичная или полная замена метанола на ацетонитрил в составе подвижной фазы в ОФ режиме приводит к незначительному уменьшению разрешения пиков. В то же время такая замена сильно влияет на удерживание веществ, что позволяет оптимизировать условия анализа по времени, получая при этом хроматограммы с хорошим разрешением пиков. В дальнейшем использовали соотношение (20 : 80) % об. ACN : MeOH, при этом значение фактора разрешения пиков составило $R_s = 2.7$, времена удерживания 4.8 минут и 7.1 минут для L- и D- формы, соответственно.

На основании полученных результатов для определения энантиомерной чистоты фармацевтического препарата на колонке Nautilus-E выбрали подвижную фазу: (55 : 15 : 30) % об. MeOH : ACN : $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (50 мМ, pH = 2.5). Хроматограмма рацемической смеси пеметрекседа в данных условиях представлена на рис. 5.

Проведенные исследования энантиоразделения пеметрекседа на сорбенте с агликоном тейкопланина в ОФ и ПИ режимах хроматографии показали, что с этим селектором энантиомеры пеметрекседа разделить невозможно. Пеметрексед практически не удерживается на сорбенте ($k' = 0.1 \div 0.2$), что соответствует данным Армстронга с соавт. [5] о влиянии структуры антибиотика на его энантиоселективность.

Агликон тейкопланина содержит только одну аминогруппу, по сравнению с тремя у эремомицина. Это уменьшает электростатические взаимодействия между макроциклическим антибиотиком и пеметрекседом, а, следовательно, на сорбенте, модифицированном агликоном тейкопланина, он удерживается слабо. Эремомицин содержит значительно больше хиральных центров по сравнению

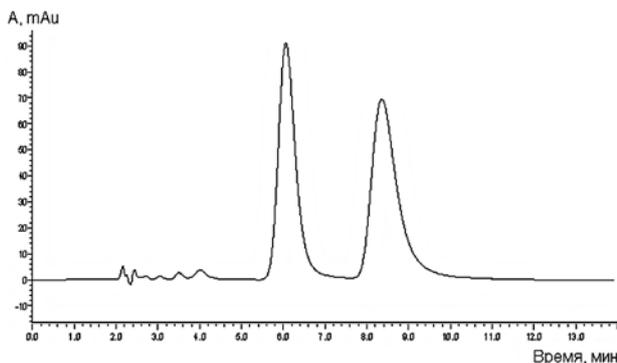


Рис. 5. Хроматограмма рацемической смеси энантиомеров пеметрекседа. Хроматографическая колонка: Nautilus-E, 250×4 мм. Подвижная фаза: (55 : 15 : 30) % об. MeOH : ACN : NH₄H₂PO₄ (50 mM, pH = 2.5)

Fig. 5. Separation of Peritrexed enantiomers. Column: Nautilus-E, 250×4 mm. Mobile phase: (55 : 15 : 30) MeOH : ACN : NH₄H₂PO₄ (50mM, pH = 2.5)

нию с агликоном тейкопланина. Лучшая селективность разделения энантиомеров с эремомицином реализуется также за счет образования водородных связей и дипольных взаимодействий с амидными и гидроксильными группами эремомицина и за счет гидрофобных взаимодействий.

Для проверки пригодности хроматографической системы хроматографировали метанольный раствор рацемата пеметрекседа в выбранных условиях пять раз. Перед началом определения хроматографическую колонку промывали подвижной фазой до формирования стабильной базовой линии. Разрешение пиков L- и D-энантиомеров пеметрекседа 2.7. Эффективность хроматографической колонки (N – число теоретических тарелок на метр) для пиков L-энантиомера и D-энантиомера

составила 3600 и 2750 теоретических тарелок, соответственно. Относительное стандартное отклонение (s_r) для площади пика L-энантиомера составило 0.05 и 0.07 для площади пика D-энантиомера.

В выбранных условиях получили хроматограммы ряда градуировочных растворов пеметрекседа и построили градуировочную зависимость площади пика D-формы от ее концентрации в смеси энантиомеров пеметрекседа (табл. 3). Предел обнаружения соединения, рассчитанный по отношению сигнал/фон = 3 : 1 составил 0.0003 мг/мл, что соответствует 0.12 % мас. D-формы по отношению к общему количеству препарата. Полученные характеристики показывают, что возможно определение и разделение энантиомеров фармпрепарата пеметрекседа с хорошей воспроизводимостью и чувствительностью.

Предложенный авторами [2] метод определения энантиомерной чистоты пеметрекседа методом нормально-фазовой хроматографии на неподвижной фазе на основе амилозы имеет существенный недостаток – предел обнаружения D-формы составлял 0.5 % мас., что не соответствует требованиям фармакопейной статьи – в препарате содержание D-формы не должно превышать 0.2 % мас. [3].

Полученные результаты позволили определить энантиомерную чистоту субстанции пеметрекседа. Анализ метанольного раствора субстанции пеметрекседа, приготовленного в день анализа, показал, что вещество не содержит примеси D-изомера.

Для проверки правильности результатов провели анализ модельного раствора субстанции, с добавкой рацемической смеси пеметрекседа, так чтобы содержание D-энантиомера составляло 10 мкг/мл, используя градуировочную зависимость. Соотношение энантиомеров в рацемической сме-

Таблица 3

Метрологические характеристики хроматографического определения D-формы пеметрекседа ($n = 3, P = 0.95$)

The metrological characteristics of the chromatographic determination of D-Peritrexed ($n = 3, P = 0.95$)

Диапазон определяемых концентраций, мг/мл	Диапазон определяемого содержания D-формы, % мас.	Уравнение градуировочной зависимости	r	s_r
0.0003-0.015	0.12 – 6	$Y = (21 \pm 1) \cdot 10^6 X + (11 \pm 5) \cdot 10^3$	0.998	0.06

Примечания: Y – площадь хроматографического пика, X – концентрация пеметрекседа, мг/мл, r – коэффициент корреляции для уравнения градуировочного графика, s_r – относительное стандартное отклонение для средней концентрации градуировочного графика.

Таблица 4

Определение содержания D-формы пеметрекседа в субстанции методом градуировочного графика и методом добавок ($n = 3, P = 0.95$)

Determination of D-Peritrexed in drug by the calibration curve method and supplements ($n = 3, P = 0.95$)

Введенная концентрация пеметрекседа, мкг/мл	Метод градуировочного графика		Метод «введено-найденно»	
	c , мкг/мл	s_r	c , мкг/мл	s_r
0	0	-	0	-
10	9 ± 1	0.06	10 ± 2	0.08

си оценивали по соотношению площадей пиков на хроматограмме и проверили, используя стандарт L-энантиомера. Содержание D-энантиомера в рацемической смеси составляет (53.0 ± 0.5) % мас. ($n = 10$, $P = 0.95$). Определение повторили методом «введено-найдено», для этого получили хроматограммы модельного раствора с добавками рацемической смеси 5, 8, 10, 20, 30 мкг/мл. Результаты определения двумя методами сходны (табл. 4), что дает нам право говорить о правильности определения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследовано влияние природы и концентрации компонентов подвижной фазы, ее состава и pH на разделение энантиомеров пеметрекседа на силикагеле, модифицированном эремомицином и агликоном тейкопланина. Показано, что разделение энантиомеров пеметрекседа оптимально на сорбенте, модифицированном эремомицином, состав подвижной фазы: (55 : 15 : 30) % об. MeOH : ACN : $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (50 мМ, pH = 2.5).

Определены метрологические характеристики методики определения пеметрекседа. Проведена оценка энантиомерной чистоты субстанции пеметрекседа, D-изомер не обнаружен.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ №15-03-05979а.

Acknowledgements

This work was supported by RFBR №15-03-05979а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Колтунов К.Ю. Энантиоселективный синтез органических соединений. Новосибирск: Новосиб. гос. ун-т., 2010. 41 с.
2. A valid chiral LC method for the determination of enantiomeric purity of pemetrexed disodium on an amylase-based chiral stationary phase / K. Ramulu [et al.] // *Chromatographia*. 2007. V. 65. P. 249-252.
3. *European Pharmacopoeia* // V. 1. (8th ed.). Strasbourg: The Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe. 2013. P. 2975-2977.

4. Ilisz I., Berkecz R., Peter A. Retention mechanism of high-performance liquid chromatographic enantioseparation on macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases // *J. Chromatogr. A*. 2009. V. 1216. P. 1845-1860.
5. Macrocyclic antibiotics as a new class of chiral selectors for liquid chromatography / D.W. Armstrong [et al.] // *Anal. Chem.* 1994. V. 66. P. 1473-1484.
6. New chiral stationary phase with macrocyclic glycopeptide antibiotic eremomycin chemically bonded to silica / S.M. Staroverov [et al.] // *J. Chromatogr. A*. 2006. V. 1108. P. 263-267.
7. Высокоэффективная жидкостная хроматография энантиомеров α -аминокислот на силикагеле с иммобилизованным эремомицином / М.А. Кузнецов [и др.] // *Журн. аналит. химии*. 2008. Т. 63. № 1. С. 64-72.
8. Beesley T.E., Scott R.P.W. *Chiral chromatography. Separation science series*. John Wiley and Sons Ltd., 1998. 552 p.

REFERENCES

1. Koltunov K.Yu. *Enantioselectivnyi sintez organicheskikh soedinenii* (The enantioselective synthesis of organic compounds), Novosibirsk, Novosibirsk State University, 2010. 41 p.
2. Ramulu K., Rao B.M., Madhavan P., Lalitha Devi M., Srinivasu M.K., Chandrasekhar K.B. A valid chiral LC method for the determination of enantiomeric purity of pemetrexed disodium on an amylase-based chiral stationary phase, *Chromatographia*, 2007, vol. 65, pp. 249-252. DOI: 10.1365/s10337-006-0139-9 0009-5893/07/02.
3. *European Pharmacopoeia*, Strasbourg: The Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe, 2013, 8th ed., pp. 2975-2977.
4. Ilisz I., Berkecz R., Peter A. Retention mechanism of high-performance liquid chromatographic enantioseparation on macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases, *Journal of Chromatography A*, 2009, vol. 1216, pp. 1845-1860. DOI:10.1016/j.chroma.2008.08.041.
5. Armstrong D.W., Tang Y.B., Chen S.S., Zhou Y.W., Bagwill C., Chen J.R. Macrocyclic antibiotics as a new class of chiral selectors for liquid chromatography, *Analytical Chemistry*, 1994, vol. 66, pp. 1473-1484. DOI: 10.1021/ac00081a019.
6. Staroverov S.M., Kuznetsov M.A., Nesterenko P.N., Vasiarov G.G., Katrukha G.S., Fedorova G.B. New chiral stationary phase with macrocyclic glycopeptide antibiotic eremomycin chemically bonded to silica, *Journal of Chromatography A*, 2006, vol. 1108, pp. 263-267. DOI:10.1016/j.chroma.2006.01.073.
7. Kuznetsov M.A., Nesterenko P.N., Vasiarov G.G., Staroverov S.M., High-performance liquid chromatography of α -amino acid enantiomers on eremomycin-modified silica, *Russian journal of Analytical Chemistry (Engl. Transl.)*, 2008, vol. 63, № 1, pp. 57-64. DOI:10.1134/S1061934808010115.
8. *Chiral chromatography. Separation science series*, T.E. Beesley, R.P.W. Scott. John Wiley and Sons Ltd., 1998. 552 p.