

## Колоночная хроматография в очистке образца генотоксичной примеси субстанции иматиниба мезилат

В. И. Крылов, С. В. Моисеев, О. В. Князькина, В. А. Яшкир, В. А. Меркулов

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, Москва, Россия

Статья поступила 11.05.2016 г. Принята к печати 30.08.2016 г.

**Резюме:** В статье показан простой способ очистки N-(5-амино-2-метилфенил)-4-(3-пиридил)-2-пиримидинамина для дальнейшего использования его в качестве стандарта при количественном определении генотоксичной примеси субстанции иматиниба мезилат. Экспериментально обоснован выбор сорбента, применяемого для очистки N-(5-амино-2-метилфенил)-4-(3-пиридил)-2-пиримидинамина. Показано преимущество колоночной хроматографии на нейтральном оксиде алюминия перед кристаллизационными методами, представленными в литературных источниках. Приведены сравнительные хроматографические и спектральные характеристики N-(5-амино-2-метилфенил)-4-(3-пиридил)-2-пиримидинамина до и после очистки. Методом ЯМР спектроскопии проведена оценка количественного содержания целевого вещества в очищенном образце.

**Ключевые слова:** N-(5-амино-2-метилфенил)-4-(3-пиридил)-2-пиримидинамин; иматиниба мезилат; генотоксичная примесь; колоночная хроматография; нейтральный оксид алюминия; ВЭЖХ; спектроскопия ЯМР.

**Библиографическое описание:** Крылов ВИ, Моисеев СВ, Князькина ОВ, Яшкир ВА, Меркулов ВА. Колоночная хроматография в очистке образца генотоксичной примеси субстанции иматиниба мезилат. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2016; (3): 42–45.

### ВВЕДЕНИЕ

Иматиниба мезилат (I) — противоопухолевый препарат, эффективно применяемый в направленной противораковой терапии при хроническом миелолейкозе [1]. Его синтез основан на взаимодействии N-(5-амино-2-метилфенил)-4-(3-пиридил)-2-пиримидинамина (II) и 4-[(4-метилпиперазин-1-ил)метил]бензойной кислоты или ее производных с дальнейшей обработкой образующегося амида метансульфокислотой и последующей перекристаллизацией полученной соли (рис. 1) [2–4]. Несмотря на проведенную очистку, фармацевтическая субстанция (I) может содержать некоторое количество исходных веществ (посторонних примесей), контроль присутствия которых осуществляется при оценке показателей качества субстанции.

Особое внимание при фармакопейном анализе качества субстанции (I) уделяется контролю остаточных количеств амина (II), который, как и большинство ароматических аминов, является генотоксичным соединением, способным вызывать онкологические заболевания [5, 6]. В соответствии с рекомендациями Европейского медицинского агентства (ЕМА), содержание соединения II в фармацевтической суб-

станции (I) не должно превышать 3 ppm [7]. В нашей стране требования к его содержанию варьируют от 0,001 до 1,0 % [8] в зависимости от фирмы-производителя. Для контроля содержания остаточных количеств II используют метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), который невозможен без наличия соответствующего стандарта. Можно сделать предположение, что у производителей фармацевтической субстанции отсутствует (или им не доступен) необходимый стандартный образец, что объясняет такую вариативность содержания исходного соединения (II) в субстанции. Характерным свойством стандартных образцов является их высокая химическая чистота, поэтому амин (II), используемый при синтезе субстанции (I) как стартовый материал, зачастую не может быть использован в качестве стандартного образца из-за содержания технологических примесей.

Целью данного исследования является разработка доступного способа очистки соединения (II) от присутствующих в нем технологических примесей, что позволит использовать его в качестве стандартного образца при фармакопейном анализе субстанции (I).

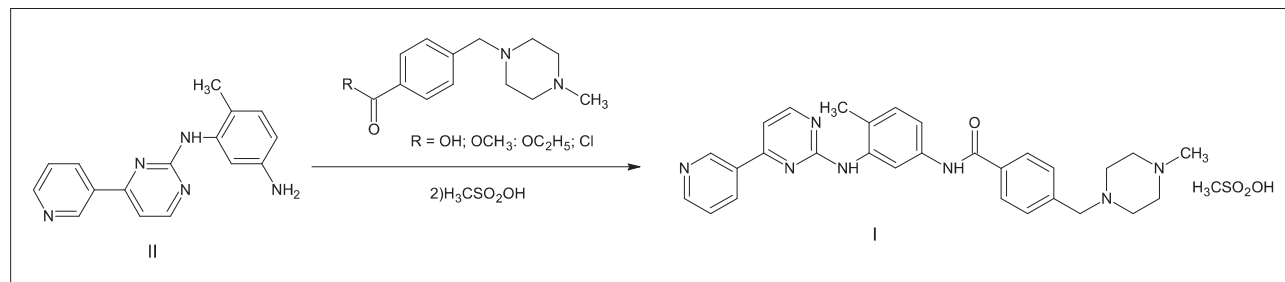


Рис. 1. Схема синтеза иматиниба мезилата

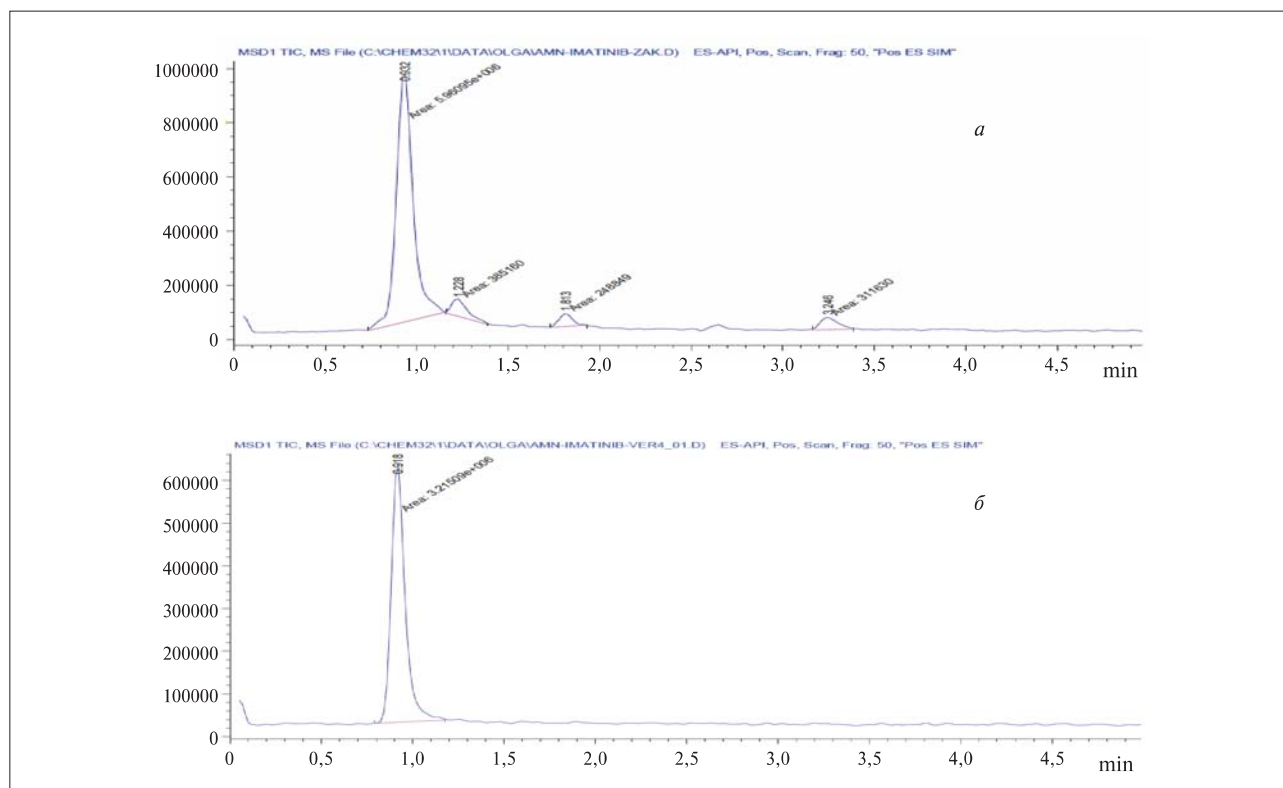


Рис. 2. Хроматограмма соединения (II): а — до очистки; б — после очистки методом колоночной хроматографии

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Регистрацию спектров ЯМР  $^1\text{H}$  производили на ЯМР-спектрометре Agilent DD2 NMR System 600 (США) с 5-мм мультядерным датчиком, оснащенным градиентной катушкой, при температуре 300 К. Анализируемые образцы в количестве 10 мг растворяли в 0,5 мл дейтерированного диметилсульфоксида (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.), шкалу химических сдвигов градуировали по отношению к сигналу дейтерированного растворителя. Содержание (II) в образце определяли методом количественной спектроскопии ЯМР с использованием внешнего стандарта по методике [9]. Эксперимент проводили при следующих условиях [10]: угол поворота намагниченности  $90^\circ$ , время релаксации 30 с, 1 накопление, число точек аналого-цифрового преобразования 64 к, экспоненциальное умножение 0,3 Гц, автоматическая коррекция базовой линии спектра, ручная настройка фазы в диапазоне спектра 0–10 м.д., диапазон интегрирования задавали вручную.

Масс-спектры получены на хроматографе Agilent Infinity 1260 с масс-селективным детектором Quadropole 6130. Условия хроматографирования: колонка Poroshell 120 EC C-18 50 мм  $\times$  4,6 мм  $\times$  2,7 мкм; температура колонки  $26^\circ\text{C}$ ; подвижная фаза — ацетонитрил-вода в соотношении 1:1 с добавлением 0,1 % муравьиной кислоты; скорость потока — 0,400 мл/мин; объем пробы — 0,5 мкл; растворитель — ацетонитрил.

Синтезированный по методике [4] (II) в количестве 300 мг растворяли в 1 мл ацетонитрила и хроматографировали на колонке диаметром 35 мм через слой высотой 100 мм нейтрального окиси алюминия производства «Chemarol» марки L40/250. Контроль выхода необходимой фракции проводили по ВЭЖХ.

Элюат собирали и упаривали досуха. Светло-желтый маслянистый остаток охлаждали до  $0^\circ\text{C}$ , затем полученную кристаллическую массу растворяли при кипении в 2 мл хлористого метилена и выкристаллизовывали при  $0^\circ\text{C}$ . Выпавшие кристаллы фильтровали, промывали 1 мл ледяного хлористого метилена и высушивали. Выход составил 100 мг целевого продукта. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ , м.д.: 2,06 (с, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4,84 (уш. с, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 6,33 (дд, J 8,0 Гц, J 2,0 Гц), 6,79 (д, J 2,0 Гц, 1H), 6,86 (д, J 8,0 Гц, 1H), 7,36 (д, J 5,3 Гц, 1H), 7,54 (дд, J 8,0 Гц, J 4,8 Гц, 1H), 8,41 (м, 1H), 8,46 (д, J 5,3 Гц, 1H), 8,66 (с, 1H, NH), 8,69 (д, J 4,8 Гц, 1H), 9,24 (с, 1H).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ результатов ВЭЖХ и ЯМР соединения (II), полученного по методике [4], показал присутствие значительного количества примесей: содержание основного компонента не превышает 92 % (рис. 2, а; 3, а). Метод очистки соединения (II) в рамках методики [4] предусматривает промывку полученного целевого продукта изопропанолом и метанолом. Следует отметить, что соединение (II) и его примеси обладают близкой растворимостью в данных растворителях, что осложняет получение (II) высокой степени чистоты. В качестве альтернативного метода очистки нами была рассмотрена возможность применения колоночной хроматографии как на силикагеле, так и на нейтральном оксиде алюминия.

Использование силикагеля в качестве сорбента вызывает значительную деструкцию очищаемого образца. Можно предположить, что наблюдаемое разложение соединения (II) связано с кислым характером содержащихся в силикагеле силанольных групп.

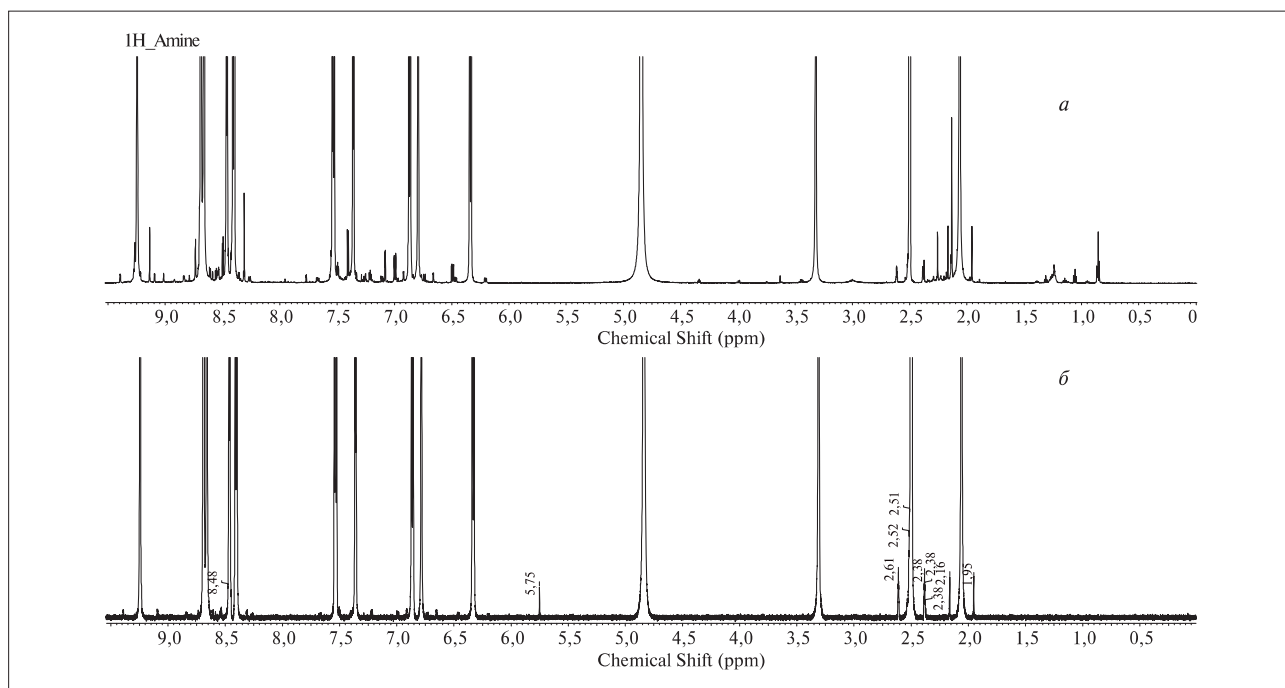


Рис. 3. Наличие примесей в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  соединения (II): а — до очистки; б — после очистки методом колоночной хроматографии

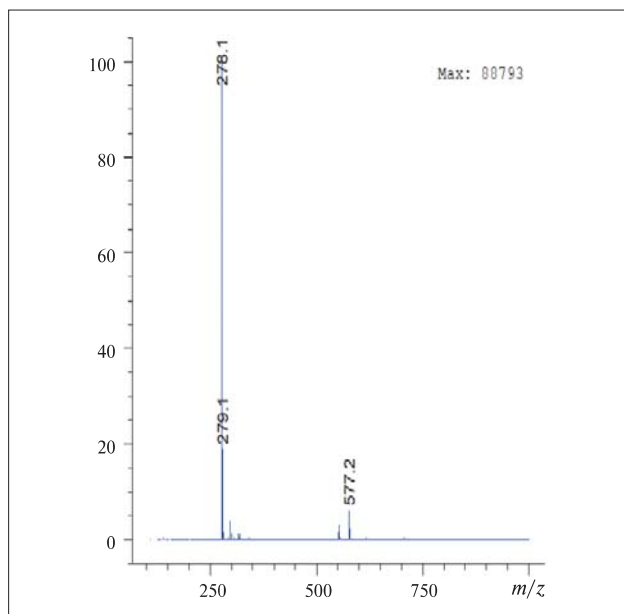


Рис. 4. Масс-спектр соединения (II)

Применение нейтрального оксида алюминия в качестве сорбента не приводит к деструкции и позволяет получить соединение (II) высокой степени чистоты: на хроматограмме (рис. 2, б) присутствует только его пик (время выхода 0,918 мин), в спектре  $^1\text{H}$  ЯМР (рис. 3, б) наблюдаются сигналы только основного соединения, в масс-спектре присутствует ион с  $m/z$  278,1 Да (рис. 4).

Методом количественной спектроскопии  $^1\text{H}$  ЯМР с использованием внешнего стандарта [9] установлено, что содержание основного компонента в очищенном соединении (II) составляет  $99,69 \pm 0,16$  %.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, использование колоночной хроматографии на нейтральном оксиде алюминия позволяет получить (II) с количественным содержанием основного компонента свыше 99 %, что дает возможность его использования в фармакопейном анализе в качестве отечественного стандартного образца для количественного определения генотоксичной канцерогенной примеси субстанции иматиниба мезилат.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Машковский МД. Лекарственные средства. 16-е изд. М.: Новая волна; 2012.
2. Патент PCT WO-2008/112722 A2 (2008). Available from: <http://goo.gl/NV9vVa>.
3. Патент PCT WO-2011/070588 A1 (2011). Available from: <http://goo.gl/9mniW1>.
4. Патент PCT WO-2004/099187 A1 (2004). Available from: <http://goo.gl/IJlv4m>.
5. Bhatt V, Prasad G, Bhatt H, Sharma A. Quantification of potential genotoxic impurity in imatinib mesylate by LC-MS/MS. Acta Chim Pharm Indica 2013; 3(2): 182–91.
6. Madireddy V, Babu SK, Narayanareddy P. Stability-indicative, validated, fast HPLC method for quantification of two genotoxic impurities in imatinib mesylate. Global J of Analit Chem. 2011; 2(5): 198–207.
7. Guideline on the limits of genotoxic impurities, CPMP/SWP/5199/02, EMEA/CHMP/QWP/251344/2006. London; 2006. Available from: <http://goo.gl/CaQzef>.
8. Лутцева АИ, Боковикова ТН, Стронова ЛА, Агапкина МВ, Буна-тян НД. Актуальность разработки унифицированного подхода к стандартизации лекарственного средства — иматиниб. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2014; (3): 9–12.
9. Crouch R, Russell D. Easy, Precise and Accurate Quantitative NMR Application note. Agilent Technologies Inc., USA; 2011. Available from: <http://goo.gl/6is1IW>.
10. Кузьмина НЕ, Моисеев СВ, Крылов ВИ, Яшкин ВА, Меркулов ВА. Возможности метода ЯМР-спектроскопии при определении микрокомпонентов смесей. Журнал аналитической химии 2014; 69(11): 1152–60.

## ОБ АВТОРАХ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2.  
 Крылов Владислав Игоревич. Ведущий инженер лаборатории нанолечарств, препаратов для клеточной и генотерапии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств.  
 Моисеев Сергей Владимирович. Эксперт 1-й категории лаборатории нанолечарств, препаратов для клеточной и генотерапии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. хим. наук.  
 Князькина Ольга Викторовна. Эксперт 2-й категории лаборатории нанолечарств, препаратов для клеточной и генотерапии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств.  
 Яшкир Вадим Анатольевич. Начальник лаборатории нанолечарств, препаратов для клеточной и генотерапии Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. хим. наук.  
 Меркулов Вадим Анатольевич. Заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств, д-р мед. наук, проф.

## АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ

Крылов Владислав Игоревич; homechem@mail.ru

# COLUMN CHROMATOGRAPHY USED IN PURIFICATION OF GENOTOXIC IMPURITY SAMPLE OF IMATINIB MESYLATE SUBSTANCE

V. I. Krylov, S. V. Moiseev, O. V. Knyazkina, V. A. Yashkir, V. A. Merkulov

Federal State Budgetary Institution  
 «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»  
 of the Ministry of Health of the Russian Federation, 127051, Moscow, Russia

**Abstract:** The article describes a simple method for purifying N-(5-amino-2-methylphenyl)-4-(3-pyridyl)-2-pyrimidineamine for further use as a standard for quantitative determination of genotoxic impurities substance imatinib mesylate. Experimentally proved choice of sorbent used for purification of N-(5-amino-2-methylphenyl)-4-(3-pyridyl)-2-pyrimidineamine. The advantage of column chromatography on neutral alumina prior to crystallization methods presented in the literature. Comparative chromatographic and spectral characteristics of N-(5-amino-2-methylphenyl)-4-(3-pyridyl)-2-pyrimidineamine before and after purification. NMR spectroscopy evaluated quantitative content of the target substance in the purified sample.

**Key words:** N-(5-amino-2-methylphenyl)-4-(3-pyridyl)-2-pyrimidineamine; imatinib mesylate; genotoxic impurity; column chromatography; neutral alumina; HPLC; NMR spectroscopy.

**For citation:** Krylov VI, Moiseev SV, Knyazkina OV, Yashkir VA, Merkulov VA. Column chromatography used in purification of genotoxic impurity sample of Imatinib Mesylate substance. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2016; (3): 42–45.

## REFERENCES

1. Mashkovsky MD. Medicines. 16th ed. Moscow; 2012 (in Russian).
2. Patent WO-2008/112722 A2 (2008). Available from: <http://goo.gl/NV9vVa>.
3. Patent WO-2011/070588 A1 (2011). Available from: <http://goo.gl/9mniW1>.
4. Patent WO-2004/099187 A1 (2004); Available from: <http://goo.gl/Jlv4m>.
5. Bhatt V, Prasad G, Bhatt H, Sharma A. Quantification of potential genotoxic impurity in imatinib mesylate by LC-MS/MS. Acta Chim Pharm Indica 2013; **3**(2): 182–91.
6. Madireddy V, Babu SK, Narayanareddy P. Stability-indicative, validated, fast HPLC method for quantification of two genotoxic impurities in imatinib mesylate. Global J of Analit Chem. 2011; **2**(5): 198–207.
7. Guideline on the limits of genotoxic impurities, CPMP/SWP/5199/02, EMEA/CHMP/QWP/251344/2006. London; 2006. Available from: <http://goo.gl/CaQzef>.
8. Lutseva AI, Bokovikova TN, Stronova LA, Agapkina MV, Bunyatyan ND. The relevance of development of a unified approach to standardization of imatinib. Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya 2014; (3): 9–12 (in Russian).
9. Crouch R, Russell D. Easy, Precise and Accurate Quantitative NMR Application note. Agilent Technologies Inc., USA; 2011. Available from: <http://goo.gl/6is1IW>.
10. Kuzmina NE, Moiseev SV, Krylov VI, Yashkir VA, Merkulov VA. Possibilities of NMR spectrometry in determining trace components of mixtures. Zhurnal analiticheskoy himii 2014; **69**(11): 1052–60 (in Russian).

## AUTHORS

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Krylov VI. Leading engineer of Laboratory of nanomedicines, medicines for cell therapy and genotherapy of Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products Quality.

Moiseev SV. 1st professional category expert of Laboratory of nanomedicines, medicines for cell therapy and genotherapy of Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products Quality. Candidate of Chemical Sciences.

Knyazkina OV. 2nd professional category expert of Laboratory of nanomedicines, medicines for cell therapy and genotherapy of Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products Quality.

Yashkir VA. Head of Laboratory of nanomedicines, medicines for cell therapy and genotherapy of Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products Quality. Candidate of Chemical Sciences.

Merkulov VA. Deputy Director-General for Evaluation of Medicinal Products. Doctor of Medical Sciences, professor.