УДК 615.214.3.07

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДОБРОКАЧЕСТВЕННОСТИ НОВОГО БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ВЕЩЕСТВА С НЕЙРОТРОПНОЙ АКТИВНОСТЬЮ NA-CPAH

[1]Макарова Е.А., [1]Сидуллина С.А., [1]Семина И.И., [2]Тарасова Р.И., [1]Мустафин Р.И.

[1]ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет»;

[2]ГБОУ ВПО «Казанский государственный технологический университет»,

Казань, e-mail: live03@yandex.ru

В настоящей работе представлены разработанные методики определения доброкачественности нового биологически активного вещества (БАВ) натриевой соли ацетилгидразино-4-хлорфенилфосфиновой кислоты (Na-CPAH), обладающего нейротропной активностью: «прозрачность раствора», «цветность раствора», «pH», «посторонние примеси», «потеря в массе при высушивании», «хлориды», «сульфаты», «сульфатная зола и тяжелые металлы». Представленные методики являются необходимыми для фармацевтического анализа и обязательными в анализе доброкачественности соединения при определении содержания посторонних примесей в лекарственных препаратах. Предложена методика идентификации посторонних примесей методом тонкослойной хроматографии в системе растворителей – этанол:хлороформ:аммиака раствор концентрированный 25 % (80:20:5) восходящим методом. Результаты испытания считаются достоверными, если на хроматограмме в УФ-свете при 254 нм четко видно одно пятно с Rf = 0,58 и возможно наличие пятна по размеру и интенсивности поглощения, не превышающее пятно СОВС. Подобранные оптимальные условия хроматографирования БАВ Na-CPAH способствуют высокочувствительному определению посторонних примесей в субстанции.

Ключевые слова: нейротропные препараты, гидразиды фосфорилированных карбоновых кислот, Na-CPAH, доброкачественность, тонкослойная хроматография, фармацевтический анализ

PURITY DETERMINATION OF A NEW BIOACTIVE SUBSTANCE NA-CPAH WITH NEUROTROPIC ACTIVITY

[1]Makarova E.A., [1]Sidullina S.A., [1]Semina I.I., [2]Tarasova R.I., [1]Moustafin R.I.

[1]Kazan State Medical University;

[2]Kazan State Technological University, Kazan, e-mail: live03@yandex.ru

The current study presents methods of purity determination of a new biologically active substance (BAS) sodium acetyl hydrazine-4-chloro-phenyl phosphinic acid (Na-CPAH) with neurotropic activity: «transparency of the solution», «color of the solution», «pH», «impurities», «loss on drying» «chlorides», «sulfates», «Sulphated ash and heavy metals». These procedures are necessary for pharmaceutical analysis, purity determination and are required to determine impurities. A thin-layer bottom-up chromatography has been suggested as a suitable method of identifying impurities in a solvent system ethanol: chloroform: concentrated ammonia solution 25 % (80:20:5). The result is considered reliable if a spot with Rf = 0,58 is identified in the chromatogram in ultraviolet light at 254 nm and there may be also determined a spot not exceeding the size and absorptive intensity of SIP spot. Optimal conditions of chromatography Na-CPAH contribute highly sensitive determination of impurities in the substance.

Keywords: neurotropic compounds, hydrazides of phosphorylacetic acid, Na-CPAH, purity determination, thin-layer chromatography, pharmaceutical analysis

Поиск новых лекарственных препаратов с нейротропной активностью привел к открытию нового ряда биологически активных веществ (БАВ) – гидразидов фосфорилированных уксусных кислот. Ранее сотрудниками кафедры фармакологии ГБОУ ВПО «КГМУ МЗ РФ» было установлено, что данные БАВ проявляют выраженные психотропные свойства, обладают антигипоксической активностью, улучшают процессы восприятия и запоминания, обладают низкой токсичностью и не проявляют антихолинэстеразной активности [7, 8].

Одним из наиболее активных представителей этого ряда является натриевая соль ацетилгидразино-4-хлорфенилфосфиновой кислоты (Na-CPAH), синтезированная на кафедре органической химии ГБОУ ВПО КНИТУ. В предыдущих работах мы установили, что исследуемое БАВ обладает выраженной антидепрессивной активностью и способностью положительно влиять на процессы обучения и памяти [6], а также разработали оптимальные методики качественного и количественного анализа Na-CPAH [5].

Важной задачей фармацевтического анализа является определение содержания посторонних примесей в лекарственных препаратах. В этой связи представляло интерес провести экспериментальную работу по выбору условий определения посторонних примесей в Na-CPAH. [1].

Целью настоящей работы является разработка методик определения доброкачественности субстанции Na-CPAH, необходимых для оценки качества данного лекарственного вещества с целью ее стандартизации.

Объектом исследования является субстанция БАВ Na-СРАН, физико-химичекие свойства которого нами были ранее изучены [5]. В качестве обязательных параметров доброкачественности ГФ регламентирует включать в ФС следующие разделы: «прозрачность раствора», «цветность раствора», «pH», «посторонние примеси», «потеря в массе при высушивании», «хлориды», «сульфаты», «сульфатная зола и тяжелые металлы», «мышьяк» и т.д. [2, 3].

Параметр «прозрачность раствора» определяли путем визуального сравнения одинакового объема испытуемой жидкости с эталоном I при освещении электрической лампы матового стекла мощностью 40 Вт, расположенной над образцом, просматривая растворы перпендикулярно вертикальной оси пробирок на черном фоне через 5 мин после приготовления эталона. Опалесценция анализируемого раствора не должна превышать опалесценцию эталона.

Прозрачность раствора. 0,1 г субстанции растворяют в 10 мл свежепрокипяченной и охлажденной воды. Полученный раствор должен быть прозрачным или выдерживать сравнение с эталоном I.

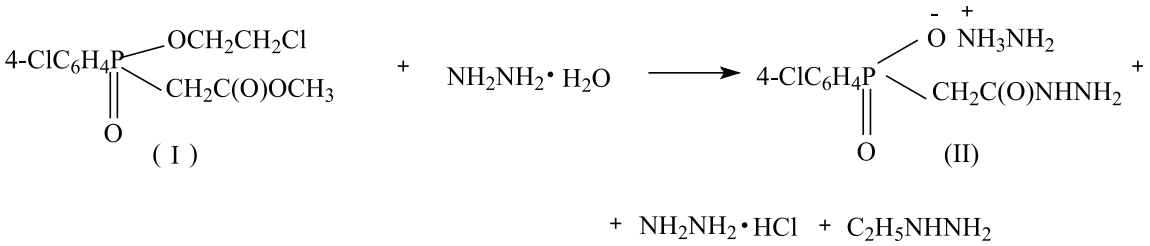
Цветность раствора определяли по стандартам для бесцветных жидкостей – раствор анализируемого вещества должен выдерживать сравнение с эталоном B9. Сравнивали окраску в отраженном свете на матово-белом фоне.

Цветность раствора. Окраска раствора, полученного в испытании на прозрачность раствора, должна быть бесцветной или выдерживать сравнение с эталоном B9.

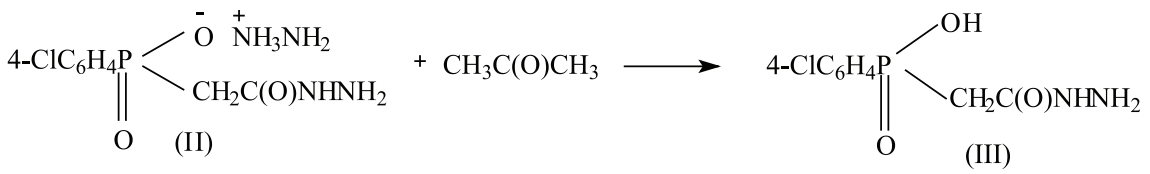
Посторонние примеси. Хроматографические методы анализа примесей в препаратах являются наиболее чувствительными и избирательными, позволяющими определить чистоту лекарственного вещества.

Синтез натриевой соли ацетилгидразино-4-хлорфенилфосфиновой кислоты состоит из трех стадий [6].

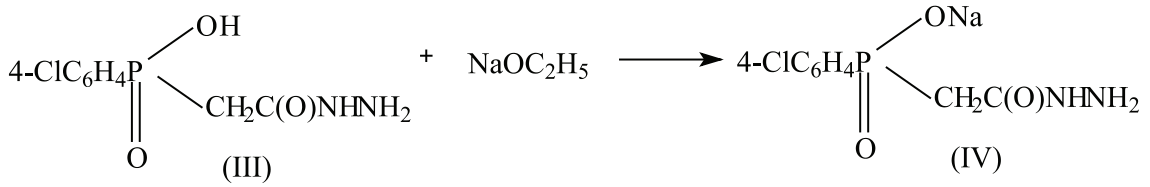
I стадия.



II стадия.



III стадия.



Одной из возможных примесей является промежуточный продукт синтеза ацетилгидразино-4-хлорфенилфосфиновая кислота (III) (НО-СРАН). Нами предложена методика определения чистоты БАВ Na-СРАН методом ТСХ. Были проведены экспериментальные исследования по параметрам методики, приведенным ниже.

Для хроматографирования выбраны пластины Sorbfil (10×15 см), марка ПТСХ-АФ-А-УФ, аналитические (ТУ 26-11-17-89), на алюминиевой подложке.

В качестве стандартного образца вещества свидетеля (СОВС) использовалась ацетилгидразино-4-хлорфенилфосфиновая кислота (чистота 100%), полученная в лаборатории органического синтеза КНИТУ. Данное соединение было охарактеризовано с помощью спектральных методов анализа в инфракрасной и ультрафиолетовой областях.

Чувствительностью обнаружения примеси 0,25 мкг.

Определен способ детектирования – в ультрафиолетовом свете при 254 нм.

Предварительно изучена хроматографическая подвижность Na-СРАН и его возможных примесей в нижеприведенных системах растворителей, рекомендованных для фосфорорганических соединений [4]:

1. Хлороформ:ацетон:этанол (6:6:1).
2. Хлороформ:ацетон (1:1).
3. Хлороформ:этанол:аммиак (15:35:1).
4. Хлороформ:ацетон:этанол:вода (24:4:4:1).
5. Ацетон:этанол:аммиак (10:10:0,5).
6. Хлороформ:ацетон:этанол (9:3:1).
7. Бензол:этанол (9:1).
8. Этанол:бензол:аммиак (30:20:1).
9. Этанол:хлороформ:NaOH (80:20:5).

Изучена возможность использования в качестве подвижной фазы воды, ацетона, хлороформа, спирта этилового, эфира, раствора аммиака, а также смесей указанных растворителей.

Для наиболее эффективного анализа веществ нами было проведено изучение оптимального количества наносимого вещества и его примеси. С этой целью наносили на линию старта хроматографических пластинок вещества в количестве 5, 10, 50, 100 и 200 мкг/мл.

На линию старта хроматографической пластинки «Sorbfil» наносили 100 мкг/мл водного раствора исследуемого БАВ и 0,5 мкг/мл его возможной примеси (НО-СРАН), хроматографирование осуществляли восходящим способом.

На основании результатов проведенных исследований для определения примесей в субстанции Na-СРАН выбрана система растворителей – этанол:хлороформ:аммиака раствор концентрированный 25% (80:20:5), в которой пятна изучаемой субстанции БАВ и примеси НО-СРАН (Rf 0,58 и 0,42 соответственно) компактны, имеют четкие границы и достаточную степень разделения.

Проверка пригодности хроматографической системы проводится по хроматограмме образца субстанции, содержащего известное количество примеси: пятна должны быть четко видны на хроматограмме и разделяться между собой (рис. 1).

Ацетилгидразино-4-хлорфенилфосфиновая кислота – посторонняя примесь БАВ Na-СРАН – была обнаружена лишь в одной из пяти серий субстанции (рис. 2).

Посторонние примеси. Определение проводят методом ТСХ.

Испытуемый раствор: 0,1 г субстанции растворяют в 10 мл воды очищенной.

На линию старта пластинки «Sorbfil» (10×15 см) наносят 10 мкл (100 мкг) испытуемого раствора и раствор СОВС, содержащий 0,5 мкг примеси. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру со смесью этанол:хлороформ:аммиака раствор концентрированный 25% (80:20:5) и хроматографируют восходящим методом. Когда фронт подвижной фазы дойдет до конца пластинки, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе и просматривают в УФ-свете при 254 нм. Пятно посторонней примеси на хроматограмме испытуемого раствора по совокупности величины и интенсивности поглощения не должно превышать пятно на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,5%).

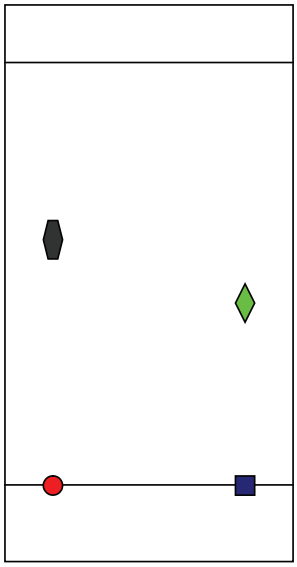


Рис. 1. Хроматограмма проверки пригодности хроматографической системы.

Условные обозначения: ● и ⬢ – Na-СРАН; ■ и ◆ – НО-СРАН

Потерю в массе при высушивании для изучаемой субстанции предлагается определять при температуре 100–105°С. Субстанцию высушивали до постоянной массы.

Потеря в массе при высушивании. Около 0,5 г (точная навеска) субстанции сушат при температуре от 100 до 105°С до постоянной массы. Потеря в массе не должна превышать 0,5%.

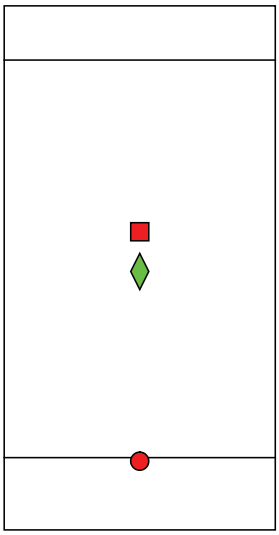


Рис. 2. Хроматограмма определения посторонних примесей в субстанции Na-СРАН

Содержание хлоридов в анализируемом БАВ определяли согласно требованиям ГФ. Опалесценция, появившаяся в испытуемом растворе, не должна превышать эталон. Предельная чувствительность реакции – 0,0001 мг (0,1 мкг) хлорид-иона в 1 мл раствора.

Хлориды. 0,5 г субстанции растворяют в 25 мл воды. 10 мл полученного раствора должны выдерживать испытание на хлориды (не более 0,01 % в субстанции).

Содержание сульфатов в изучаемом БАВ основывалось на способности сульфат-ионов образовывать с растворами солей бария белый осадок. Испытуемый раствор должен выдерживать испытание в сравнении с эталоном.

Сульфаты. 10 мл раствора, полученного в испытании на хлориды, должны выдерживать испытание на сульфаты (не более 0,05 % в субстанции).

Для определения сульфатной золы точную навеску субстанции помещали в предварительно взвешенный фарфоровый тигель, смачивали в 1 мл серной кислоты концентрированной и прокаливали при температуре около 600°С до постоянной массы в муфельной печи. По окончании прокаливания тигель охлаждали в эксикаторе и взвешивали.

Сульфатная зола и тяжёлые металлы. Сульфатная зола из 1 г субстанции (точная навеска) не должна превышать 0,1 % и должна выдерживать испытание на тяжёлые металлы (не более 0,0005 % в субстанции).

Мышьяк. 0,5 г субстанции не должны давать реакции на мышьяк.

Выводы

1. Разработанные методики определения прозрачности, цветности раствора, pH, потери в массе при высушивании, примесей хлоридов, сульфатов, мышьяка, сульфатной золы и тяжелых металлов позволяют надежно контролировать доброкачественность БАВ Na-СРАН.

2. Подобранные оптимальные условия хроматографирования БАВ Na-СРАН способствуют высокочувствительному определению посторонних примесей в субстанции.

Список литературы

1. Буряк В. П. Определение содержания примесей в лекарственных веществах методом тонкослойной хроматографии // Реализация научных достижений в практической фармации: Тез. докл. респ. науч. конф., 16–18 окт. 1991 г. Харьков. – 1991. – С. 155–156.
2. Государственная Фармакопея СССР. – 11-е изд. – Т.1.(1985). – М.: Медицина, 1987. – 336 с.
3. Государственная Фармакопея РФ. – 12-е изд. – Часть 1(2008). – М.: Медицина, 2008. – 704 с.
4. Литвиненко А.В., Тарасова Р.И., Пинягин К.В. Контроль за качеством фосфабензида // Казан. мед. журн. – 1995. – Т. 76, № 3. – С. 204–205.
5. Разработка методик контроля качества биологически активного вещества Na-СРАН, обладающего нейротропной активностью / Е.А. Макарова, С.А. Сидуллина, И.И. Семина, Р.И. Тарасова, Р.И. Мустафин // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 5. – URL: http://www.science-education.ru/105-7330.
6. Синтез и нейротропная активность в ряду гидразидов фосфорилуксусных кислот / Е.А. Макарова, Р.И. Тарасова, И.И.Семина, Ш.А. Фаттахов, Е.В. Шиловская, И.П. Пашина, А.З. Байчурина, О.В. Воскресенская, Р.С. Гараев // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 8 (ч. 2). – С. 470–473.
7. Психотропная активность незамещенных производных фосфорилацето-гидразидов / И.И. Семина, Н.А. Тихонова, А.З. Байчурина, Е.В. Шиловская, Р.И. Тарасова, Р.С. Гараев // Хим.-фарм. журнал. – 2002. – Т. 36, в. 2. – С. 3–5.
8. Структура и биологическое действие потенциальных психотропных средств фосеназида и КАПАХ. Сравнительный анализ / Р.И. Тарасова, И.И. Семина, О.В. Воскресенская, М.Л. Ларина, Э.А. Мухутдинов, И.А. Литвинов, А.Т. Губайдуллин // Хим.-фарм. журнал. – 2007. – Т. 41, № 2. – С. 11–14.

References

1. Burjak V. P. Opredelenie soderzhanija primesej v lekarstvennyh veshhestvah metodom tonkoslojnoj hromatografii. Realizacija nauchnyh dostizhenij v prakticheskoj farmacii: Tez. dokl. resp. nauch. konf., 16-18 okt. 1991 g. Har'kov. 1991. pp. 155–156.
2. Gosudarstvennaja Farmakopeja SSSR. 11-e izd. T.1.(1985) M.: Medicina, 1987. 336 p.
3. Gosudarstvennaja Farmakopeja RF. 12-e izd. Chast' 1(2008) M.: Medicina, 2008. 704 p.
4. Litvinenko A.V., Tarasova R.I., Pinjagin K.V. Kontrol' za kachestvom fosfabenzida // Kazan. med. zhurn. 1995. T.76, no. 3. pp. 204–205.
5. Makarova E.A., Sidullina S.A., Semina I.I., Tarasova R.I., Mustafin R.I. razrabotka metodik kontrolja kachestva biologicheski aktivnogo Veshhestva Na-CPAH, obladajushhego nejrotropnoj aktivnost'ju // Sovremennye problemy nauki i obrazovanija. 2012. no. 5; URL: http://www.science-education.ru/105-7330.
6. Makarova E.A, Tarasova R.I., Semina I.I., Fattahov S.A., Shilovskaja E.V., Pashina I.P., Bajchurina A.Z., Voskresenskaja O.V., Garaev R.S./ Sintez i nejrotropnaja aktivnost' v rjadu gidrazidov fosforiluksusnyh kislot // Fundamental'nye issledovanija zh.,2012, t.2, no. 8 (chast' 2) 2012, pp. 470–473.
7. Semina I.I., Tihonova N.A., Bajchurina A.Z., Shilovskaja E.V., Tarasova R.I., Garaev R.S. / Psihotropnaja aktivnost' nezameshhennyh proizvodnyh fosforilaceto-gidrazidov. // Him.-farm. zhurnal, 2002, t. 36, Vol. 2, pp. 3–5.
8. Tarasova R.I., Semina I.I., Voskresenskaja O.V., Larina M.L., Muhutdinov Je.A., Litvinov I.A., Gubajdullin A.T. / Struktura i biologicheskoe dejstvie potencial'nyh psihotropnyh sredstv fosenazida i KAPAH. Sravnitel'nyj analiz. // Him.-farm. zhurnal, 2007, t. 41, no. 2, pp. 11–14.

Рецензенты:

Егорова С.Н., д.фарм.н., профессор, заведующая кафедрой ФПК и ППС, ГБОУ ВПО «КазГМУ», г. Казань;

Шакирова Д.Х., д.фарм.н., профессор кафедры управления и экономики фармации, ГБОУ ВПО «КазГМУ», г. Казань.

Работа поступила в редакцию 04.02.2013.