

РОЗРОБЛЕННЯ МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ФЕНАТРАЗОЛУ – ПОТЕНЦІЙНОГО ПРОТИЕПІЛЕПТИЧНОГО ЗАСОБУ

Ключові слова: фармацевтичний аналіз, ідентифікація, кількісне визначення, протиепілептичний засіб

Епілепсія на сьогодні є одним з найрозповсюдженіших захворювань. За оцінками ВООЗ кількість чоловік, що страждають на цю хворобу, з кожним роком росте [5]. Існуючі протисудомні препарати не характеризуються специфічністю, тому пошук нових ефективних біологічно активних сполук з протиепілептичною дією є актуальним [5, 6].

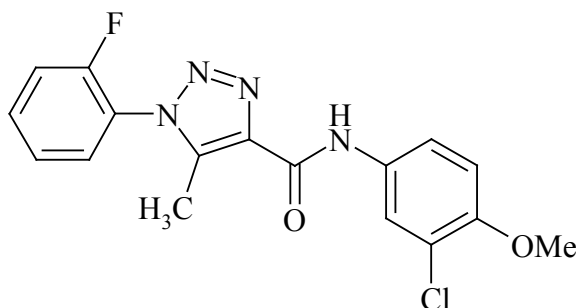
Останнім часом синтезовано велику кількість похідних триазолу, які виявили протисудомну активність. Встановлено, що ці похідні впливають на центральну нервову систему, зокрема скорочують судоми, викликані різними судомними отрутами [7, 8, 9].

У Національному фармацевтичному університеті синтезовано низку похідних 1,2,3-триазолу, серед яких аніліди 1-(2'-фторфеніл)-5-метил-1,2,3-триазол(1*H*)-4-карбонової кислоти мають виражену протисудомну активність [1, 2].

Метою дослідження було розроблення методик ідентифікації та кількісного визначення фенатразолу з метою подальшого застосування їх для стандартизації субстанції.

Матеріали та методи дослідження

Об'єкт дослідження – фенатразол (4-метокси-3-хлоранілід 1-(2'-фторфеніл)-5-метил-1,2,3-триазол(1*H*)-4-карбонової кислоти), синтезований на кафедрі фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету.



Фенатразол

Для ідентифікації досліджуваної речовини за вимогами Державної Фармакопеї України використовували комплекс фізичних (визначення температури плавлення), хімічних та фізико-хімічних (ІЧ-, УФ-спектроскопія) методів аналізу. Досліди здійснювали згідно з вимогами Державної Фармакопеї України щодо субстанцій [3, 4].

Для досліджень використовували хроматографічно чистий зразок 4-метокси-3-хлораніліду 1-(2'-фторфеніл)-5-метил-1,2,3-триазол(*1H*)-4-карбонової кислоти (вміст домішок менш ніж 0,5%). В роботі застосовували мірний посуд класу А, реактиви, які відповідають вимогам ДФУ, аналітичні ваги «AXIS», спектрофотометр «SPECORD 200» (Німеччина), рідинний хроматограф ProStar фірми «Varian» (США). ІЧ-спектр записано на приладі «Specord M-80» (Німеччина) у таблетках KBr, концентрація речовини 1%. Температуру плавлення визначали згідно з вимогами ДФУ [3].

Ідентифікація.

Температура плавлення 145–147 °С.

Інфрачервоний спектр поглинання субстанції має відповідати спектру СЗ 4-метокси-3-хлораніліду 1-(2'-фторфеніл)-5-метил-1,2,3-триазол(*1H*)-4-карбонової кислоти.

0,10 г речовини розчиняють у 96%-му спирті *P* і доводять об'єм розчину тим самим спиртом до 100,0 мл. 1,0 мл одержаного розчину доводять 96%-м спиртом *P* до об'єму 100,0 мл. Ультрафіолетовий спектр поглинання одержаного розчину в ділянці від 220 нм до 350 нм повинен мати максимуми за довжини хвилі 228 нм та 282 нм. Відношення оптичної густини в максимумі за довжини хвилі 228 нм до оптичної густини в максимумі за довжини хвилі 282 нм має бути від 1,1 до 1,3.

До 0,05 г речовини додають 2 мл води *P*, 2 мл кислоти хлористоводневої *P* та нагрівають на водяній бані протягом 5 хв. Після охолодження одержаний розчин дає реакцію на первинні ароматичні аміни (2.3.1) із утворенням червоного забарвлення.

Кількісне визначення. 0,300 г досліджуваної речовини розчиняють у 10 мл диметилформаміду, попередньо нейтралізованого за тимоловим синім, і титрують 0,1 М розчином натрію метилата до синього забарвлення.

1 мл 0,1 М розчину натрію метилата відповідає 36,08 мг $C_{17}H_{14}ClFN_4O_2$, якого має бути від 98,5% до 101,5% у перерахунку на суху речовину.

Супровідні домішки. Визначення здійснюють методом рідинної хроматографії.

Розчини готують безпосередньо перед використанням.

Випробуваний розчин. 50,0 мг речовини розчиняють в ацетонітрилі *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50,0 мл.

Розчин порівняння (*a*). 2,0 мл випробовуваного розчину доводять ацетонітрилом *P* до 10,0 мл.

Розчин порівняння (*b*). 10,0 мг СЗ 4-метокси-3-хлораніліду ацетooцтової кислоти (домішка *A*) та 5,0 мг СЗ 2-фторфенілазиду (домішка *B*) розчиняють в ацетонітрилі *P* та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100,0 мл.

Розчин порівняння (*c*). До 1,0 мл розчину порівняння (*b*) додають 50,0 мг СЗ 4-метокси-3-хлораніліду 1-(2'-фторфеніл)-5-метил-1,2,3-триазол(*1H*)-4-карбонової кислоти та доводять об'єм розчину ацетонітрилом *P* до об'єму 50,0 мл.

Розчин порівняння (*d*). 1,0 мл розчину порівняння (*b*) доводять розчину ацетонітрилом *P* до об'єму 50,0 мл.

Колонка:

розмір 250х4,6 мм,

Microsorb 100 C_{18} , 5 μ m.

Рухома фаза: ацетонітрил *P*–вода *P* (75:25), в %. Швидкість рухомої фази: 1,0 мл/хв. Температурний режим: 30 °С. Детектування: спектрофотометрично за довжини хвилі 270 нм. Об'єм проби, що вводиться: 10 мкл; вводять випробовуваний розчин і розчини порівняння (*a*), (*c*) и (*d*). Час хроматографування: у 5 разів більше часу утримування 4-метокси-3-хлораніліду 1-(2'-фторфеніл)-5-метил-1,2,3-триазол(*1H*)-4-карбонової кислоти. Відносний час утримування: час утримування 4-метокси-3-хлоранілід 1-(2'-фторфеніл)-5-метил-1,2,3-триазол(*1H*)-4-карбонової кислоти близько 9,3 хв;

домішки *C* – близько 0,6 хв; домішки *A* – близько 0,8 хв; домішки *B* – близько 0,86 хв; домішки *D* – близько 0,9 хв.

Придатність хроматографічної системи – розчин порівняння (*c*):
коефіцієнт розділення: не менш ніж 1,2 для піків домішки *A* та домішки *B*.

Нормування:

домішка *A*: площа піка не має перевищувати площу відповідного піка на хроматограмі розчину порівняння (*d*) (0,2%),

будь-яка інша домішка: площа піка не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (*a*) (0,1%),

сума інших домішок: сума площ піків не має перевищувати 5 площ основного піка на хроматограмі розчину порівняння (*a*) (0,5%),

не враховують: піки, площа яких становить менше, ніж половина площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (*a*) (0,05%).

Результати дослідження та обговорення

Аналізуючи ІЧ-спектр фенатразолу (рис. 1) можна відзначити ряд характеристичних смуг, що проявляються завдяки наявності тих чи інших функціональних груп. Особливу увагу при цьому ми приділили тим групам, що не можуть бути доведені іншими методами.

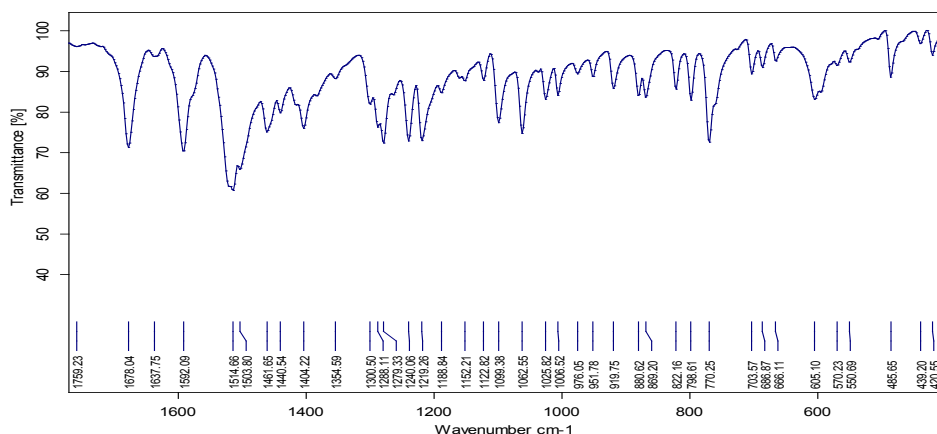


Рис. 1. ІЧ-спектр фенатразолу (4-метокси-3-хлораніліду 1-(2'-фторфеніл)-5-метил-1,2,3-триазол(1*H*)-4-карбонової кислоти)

На рис. 1 подано характеристичні смуги поглинання, що підтверджують наявність ароматичних кілець, зокрема бензольного та триазольного, карбонільної групи (амід-1, амід-2 та ін.), ацильованої аміногрупи та метильних груп.

Загалом, ІЧ-спектр дає змогу підтвердити наявність у структурі практично всіх функціональних груп, а також свідчить про чистоту одержаної речовини. Для ідентифікації цей метод може бути застосовано відповідно до рекомендацій ДФУ з використанням стандартного зразка або еталонного спектра [3].

УФ-спектр 0,01%-го спиртового розчину досліджуваної сполуки в ділянці від 220 до 340 нм має два максимуми поглинання за довжини хвилі 228 нм та 282 нм, які зумовлені наявністю супряженої системи гетероциклічного та ароматичного циклів (рис. 2). Для підвищення специфічності методики знаходили відношення оптичної густини в максимумі за довжини хвилі 228 нм до оптичної густини в максимумі за довжини хвилі 282 нм, яке має бути від 1,1 до 1,3.

Хроматографування здійснювали на двоканальній градієнтній системі ProStar фірми «Varian», використовуючи колонку Microsorb 100 C₁₈, 5 μm розміром 250x4,6 мм. Як рухому фазу використовували суміш розчинників, а саме: ацетонітрил *P* – вода *P* (75:25), в %. Швидкість рухомої фази становила 0,1 мл/хв. Температура колонки становила 30 °С. Детектування здійснювали за довжини хвилі 270 нм.

Такі умови хроматографування забезпечують досить високу ефективність хроматографічної колонки (4 000 теоретичних тарілок) та коефіцієнт симетрії піка (1,5), розраховані для піка 4-метокси-3-хлоранілід 1-(2'-фторфеніл)-5-метил-1,2,3-триазол(1*H*)-4-карбонової кислоти з хроматограм розчину порівняння (*a*) (рис. 3).

Час хроматографування у разі визначення супровідних домішок має бути у 5 разів більшим, ніж час утримування піка 4-метокси-3-хлораніліду 1-(2'-фторфеніл)-5-метил-1,2,3-триазол(1*H*)-4-карбонової кислоти. Вміст в речовині супровідних домішок має бути: 4-метокси-3-хлораніліду ацетооцтової кислоти – не більше, ніж 0,2%; будь-якої іншої – не більше, ніж 0,1%; сума домішок – не більше, ніж 0,5%. Не враховують піки, площа яких становить менше половини площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння.

Серед неспецифічних домішок, які рекомендовано визначати в цій речовині, є важкі метали, залізо та хлориди, а також кислотність та лужність водного витягу та залишкова кількість метилового спирту. Визначення цих домішок регламентується Державною Фармакопеею України [3].

На підставі даних літератури можна передбачити можливість застосування для кількісного визначення декількох хімічних методів – неводне кислотно-основне титрування (ґрунтуючись на кислотних властивостях амідної групи або основних властивостях азоту триазинового циклу), метод аргентометрії (після попереднього переведення ковалентно пов'язаного хлору в іоній).

За нашими дослідженнями метод кислотно-основного титрування в неводному середовищі давав відтворювані та близькі до номінального значення результати. Для посилення кислотних властивостей речовини титрування виконували в середовищі диметилформаміду, який має досить високу величину рK_t=25,3. Окрім того, з усіх розчинників, наведених у ДФУ, він найкращим чином розчиняє досліджувану речовину. Як титрант використовували 0,1 М розчин натрію метилату з індикаторним фіксуванням кінцевої точки титрування.

У таблиці подано отримані результати та метрологічні характеристики цього методу.

Т а б л и ц я

Кількісне визначення фенатразолу методом кислотно-основного титрування у неводному середовищі

№ з/п	Титр, г/мл	Коефіцієнт поправки 0,1М CH ₃ ONa	Маса наважки, г	Знайдено, %	Метрологічні характеристики середнього результату
1	0,03608	0,9902	0,3004	99,81	$\bar{x} = 99,99$ $S^2 = 0,4936$ $S = 0,7026$ $S_{\bar{x}} = 0,2868$ $\Delta x = 1,8057$ $\Delta \bar{x} = 0,7372$ $\varepsilon = 1,81\%$ $\bar{\varepsilon} = 0,74\%$
2			0,3007	100,30	
3			0,3010	100,20	
4			0,3001	99,90	
5			0,2995	99,51	
6			0,3008	100,23	

В и с н о в к и

1. Розроблено методи ідентифікації фенатразолу (4-метокси-3-хлораніліду 1-(2'-фторфеніл)-5-метил-1,2,3-триазол(1*H*)-4-карбонової кислоти) з використанням хімічних реакцій та спектральних методів аналізу – ІЧ- та УФ-спектроскопії.

2. Для визначення сторонніх домішок у субстанції рекомендовано метод рідинної хроматографії. Визначено регламентовані специфічні та неспецифічні домішки.

3. Розроблено методику кількісного визначення субстанції методом кислотно-основного титрування у неводному середовищі.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Георгіяни В. А., Глущенко А. В., Перехода Л. О., Заремба О. В.* Синтез, фізико-хімічні та фармакологічні властивості похідних 1-арил-5-метил-1,2,3-триазол(1*H*)-4-карбонової кислоти // Запорозж. мед. журн. – 2007. – № 3 (42). – С. 91–94.
2. *Георгіяни В. А., Глущенко А. В., Перехода Л. О., Коваленко С. М.* Синтез нових потенційних антиконвульсантів в ряду метоксианілідів 1-арил-5-метил-1,2,3-триазол(1*H*)-4-карбонових кислот // Укр. вісник психоневрології. – 2006. – Т. 14, Вип. 2 (47). – С. 102–105.
3. Державна Фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків, 2001. – Доповнення 1. – 2004. – 520 с.
4. Державна Фармакопея України / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 1-е вид. – Доповнення 4. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2011. — 540 с.
5. *Abraham D. J.* Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery. – A Wiley-Interscience Publication, A John Wiley and Sons, Inc. – 2003. – V. 2. – Drug Discovery and Drug Development Sixth Edition. – 817 p.
6. *Tomson T., Dahl M., Kimland E.* Therapeutic monitoring of antiepileptic drugs for epilepsy // Cochrane Database Syst Rev. – 2007. – V. 1. – P. 216.
7. *Chen Jing, Xian-Yu Sun, Kyu-Yun Chai et al.* Synthesis and anticonvulsant evaluation of 4-(4-alkoxyphenyl)-3-ethyl-4*H*-1,2,4-triazoles as openchain analogues of 7-alkoxyl-4,5-dihydro[1,2,4]triazolo[4,3-*a*]quinolines // Bioorg. Med. Chem. – 2007. – V. 15, N 21. – P. 6775–6781.
8. *Kadaba P. K.* Rational drug design and the discovery of the delta2-1,2,3-triazolines, a unique class of anticonvulsant and antiischemic agents // Curr. Med. Chem. – 2003. – V. 10, N 20. – P. 2081–2108.
9. *Ulloora S., Shabaraya R., Adhikari A. V.* Facile synthesis of new imidazo[1,2-*a*]pyridines carrying 1,2,3-triazoles via click chemistry and their antiepileptic studies // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2013. – V. 23, N 11. – P. 3368–3372.
10. *Plech T., Luszczki J. J., Wujec M. et al.* Synthesis, characterization and preliminary anticonvulsant evaluation of some 4-alkyl-1,2,4-triazoles // Eur. J. Med. Chem. – 2013. – N 60. – P. 208–215.

Надійшла до редакції 15. 10. 2013.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ФЕНАТРАЗОЛА – ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ПРОТИВОЭПИЛЕПТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА

Ключевые слова: фармацевтический анализ, идентификация, количественное определение, противоэпилептическое средство

А Н Н О Т А Ц И Я

Поиск новых биологически активных веществ с противоэпилептическим действием является перспективным направлением фармацевтической науки. В Национальном фармацевтическом университете синтезирован ряд производных 1,2,3-триазола, которые в эксперименте проявили выраженную противосудорожную активность. Неотъемлемым условием внедрения нового биологически активного соединения в медицинскую практику является разработка методик контроля его качества.

Цель работы – разработка методик идентификации и количественного определения фенатразола для их дальнейшего применения в стандартизации субстанции.

Для идентификации исследуемого вещества использован хроматографически чистый образец фенатразола, методы спектрофотометрии в ИК- и УФ-области спектра, жидкостную хроматографию.

Изучены физико-химические свойства и спектральные характеристики фенатразола, предложены химические методы идентификации. Подобраны оптимальные условия определения сопутствующих примесей методом ВЭЖХ и количественного определения исследуемого вещества методом кислотно-основного титрования в неводной среде.

Разработаны методы идентификации фенатразола с использованием химических реакций и спектральных методов анализа – ИК- и УФ-спектроскопии. Для определения сопутствующих примесей в субстанции рекомендован метод жидкостной хроматографии. Определены регламентированные специфические и неспецифические примеси. Разработана методика количественного определения субстанции методом кислотно-основного титрования в неводной среде.

*N. Yu. Bevz, L. O. Perekhoda, V. A. Georgiyants
National University of Pharmacy, Kharkiv*

DEVELOPMENT OF QUALITY CONTROL METHODS FOR PHENATRAZOLE – A POTENTIAL ANTI-EPILEPTIC

Key words: pharmaceutical analysis, identification, quantitative determination, anti-epileptic

ABSTRACT

The search for new biologically active substances with the anti-epileptic effect is a promising direction for pharmaceutical science. A number of derivatives of 1,2,3-triazole with an expressed anticonvulsant activity in the experiment has been synthesized in the National University of Pharmacy. An essential condition for introduction of a new biologically active compound into clinical practice is development of methods for its quality control.

Development of the methods of phenatrazole identification and its quantitative determination for their further application in standardization of the substance.

Chromatographically pure sample of phenatrazole, IR- and UV-spectrophotometry methods, liquid chromatography.

The physical and chemical properties and spectral characteristics of phenatrazole have been investigated, the chemical methods of identification have been proposed. The optimal conditions for determination of the related substances by HPLC method have been selected. The titrimetric method for the assay of the substance investigated (acid-base titration in the non-aqueous medium) has been developed.

The methods of identification of phenatrazole based on chemical reactions and IR- and UV-spectroscopy have been developed. The method of HPLC has been recommended for determination of the related substances. Permitted specific and nonspecific impurities have been identified. For quantitative determination the titrimetric method (acid-base titration in the non-aqueous medium) has been developed.

Електронна адреса для листування з авторами: natali.chek@mail.ru