

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

DOI: 10.30906/0023-1134-2018-52-9-43-48
© Коллектив авторов, 2018

Л. М. Гаевая, Л. Н. Грушевская, М. С. Сергеева, А. А. Илларионов,
Н. И. Авдюнина, Б. М. Пятин, Ф. С. Байбуртский, Г. В. Мокров

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И РАЗРАБОТКА МЕТОДИК АНАЛИЗА СУБСТАНЦИИ НОВОГО ОРИГИНАЛЬНОГО АНКСИОЛИТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ГМЛ-1

ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова”, Россия, Москва; e-mail: otopharm@mail.ru

В настоящей работе изучены физико-химические свойства и разработаны методики анализа субстанции нового оригинального соединения ГМЛ-1 с анксиолитическим действием. Определены основные фармакопейные показатели качества. Исследования проведены с применением методов ИК-спектроскопии, УФ-спектрофотометрии, ВЭЖХ, метода Кельдаля.

Ключевые слова: ГМЛ-1; ИК-спектроскопия; УФ-спектрофотометрия; ВЭЖХ; метод Кельдаля.

ГМЛ-1 — новое биологически активное соединение, производное пирроло[1,2-*a*]пиазина (I), синтезированное в ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова”. Предварительные доклинические исследования показали перспективность его применения в медицинской практике в качестве потенциального нейрорепрессивного средства, обладающего анксиолитической, антидепрессивной, ноотропной и нейропротективной активностью [1 – 3]. При этом установлено, что I обладает низкой острой токсичностью, $LD_{50} > 1000$ мг/кг, и проникает через гематоэнцефалический барьер [4].

Целью настоящего исследования являлось изучение физико-химических свойств, разработка и обоснование методик анализа и контроля качества субстанции I.

Экспериментальная часть

По химической структуре I представляет собой N-бензил-N-метил-1-фенилпирроло[1,2-*a*]пиазин-3-карбоксамид (рис. 1).

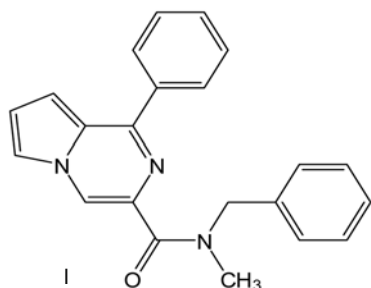


Рис. 1. Структурная формула ГМЛ-1 ($C_{22}H_{19}N_3O$, молек. масса 341,41).

Исследование проводили на серийных образцах субстанции I, синтезированных в отделе химии лекарственных средств ФГБНУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова” под руководством Т. А. Гудашевой.

В качестве веществ сравнения и свидетелей при разработке методик анализа I были использованы серийные образцы субстанции I и промежуточные продукты синтеза субстанции: морфолид бензойной кислоты; пирролфенилкетон; N-бензил-N-метиламин; бензилметиламид акриловой кислоты; бензилметиламид 2,3-дибромпропионовой кислоты; бензилметиламид 2-азидоакриловой кислоты. Образцы указанных соединений синтезированы и предоставлены для исследований отделом химии лекарственных средств ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова”.

ИК-спектры субстанции I получены в таблетках калия бромида на ИК-спектрометре Bruker Vertex 70 (Германия). УФ-спектры были сняты на УФ-спектрофотометре UV-1700 (Shimadzu, Япония).

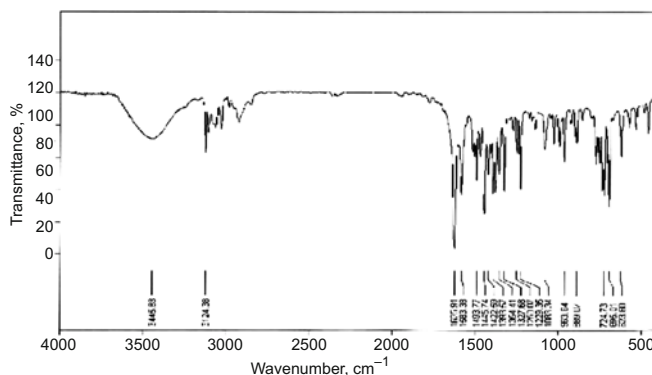


Рис. 2. ИК-спектр субстанции I (KBr).

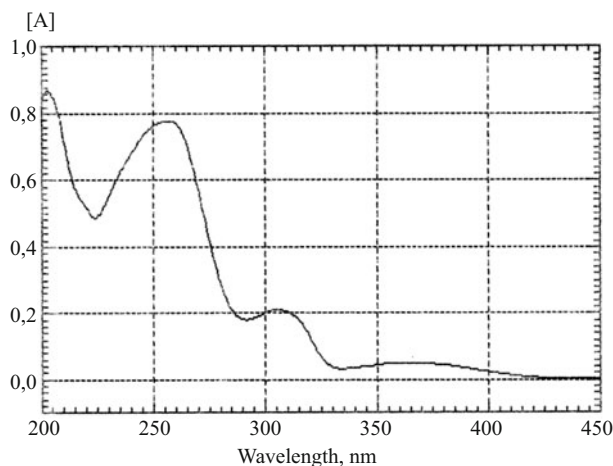


Рис. 3. УФ-спектр 0,0008 % раствора субстанции I в этаноле.

Изучение хроматографической подвижности I и его технологических примесей проводили методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе LC-10AT (Shimadzu, Япония), снабженном УФ-детектором UV-VIS SPD-10A с переменной длиной волны.

Количественную оценку I проводили определением общего азота в органических соединениях методом Кьельдаля. Минерализацию проб проводили на аппарате DK 6 (VELP scientifica, Италия) с вакуумным насосом JP и скруббером SMS (VELP scientifica, Италия). Перегонку с водяным паром проводили на приборе UDK 139 (VELP scientifica, Италия).

Результаты и их обсуждение

По внешнему виду субстанция I представляет собой кристаллический порошок зеленовато-желтого цвета, растворимый в хлороформе и ацетоне, умеренно растворимый в этаноле, очень мало растворимый в гексане и практически нерастворимый в воде.

Потеря в массе при высушивании при температуре 105 °C не превышала 0,2 % для всех серийных образцов субстанции.

Значения температуры плавления субстанции I составляли от 114 до 117 °C, при этом плавление прошло без разложения, в интервале 2 градусов. Поскольку субстанция I практически нерастворима в воде, для оценки показателя “Прозрачность” были

приготовлены 3 % растворы субстанций в хлороформе. Все образцы выдерживали сравнение с эталоном I. Определение показателя “Цветность” не проводили, так как субстанция I представляет собой окрашенный порошок. Показатель “рН” также определен не был в связи с ограниченной растворимостью исследуемой субстанции в воде.

Для подтверждения подлинности субстанции I выбраны методы ИК-спектроскопии и УФ-спектрофотометрии.

В ИК-спектрах присутствуют следующие характеристические полосы поглощения (см^{-1}): 3000 – 3124 — валентные колебания связи С-Н ароматических и гетероароматических фрагментов; 2850 – 3000 — валентные колебания связи С-Н алифатических фрагментов; 1627 — валентные колебания связи С=О (амид I); 1583, 1494 и 1445 — валентные колебания С=C и С=N ароматических и гетероароматических фрагментов; 1423 — деформационные колебания связи N-CH₃ (рис. 2).

В УФ-спектрах 0,001 и 0,0008 % растворов субстанции I в этаноле в диапазоне длин волн от 200 до 450 нм наблюдались 4 максимума: (203 ± 1), (257 ± 1); (306 ± 1) и (364 ± 1) нм, и 3 минимума: (335 ± 1), (292 ± 1) и (224 ± 1) нм (рис. 3).

В процессе технологии синтеза субстанции в образцах могут присутствовать примеси исходных и промежуточных продуктов синтеза: морфолид бензойной кислоты (II); пирролфенилкетон (III); N-бензил-N-метиламин (IV); бензилметиламид акриловой кислоты (V); бензилметиламид 2,3-дибромпропионовой кислоты (VI); бензилметиламид 2-азидоакриловой кислоты (VII) (рис. 4).

Исходя из особенностей структуры указанных соединений, для определения их содержания в субстанции I был выбран метод ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием.

Разделение I и примесей проводили на стальной колонке длиной 150 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненной сорбентом Hypersil BDS C18, с размером частиц 5 мкм (Thermo Scientific). Подвижная фаза представляла собой смесь 0,02 М раствора калия гидрофосфата одноосновного (рН 4,75), ацетонитрила и метанола (75:75:50). Режим элюирования — изократи-

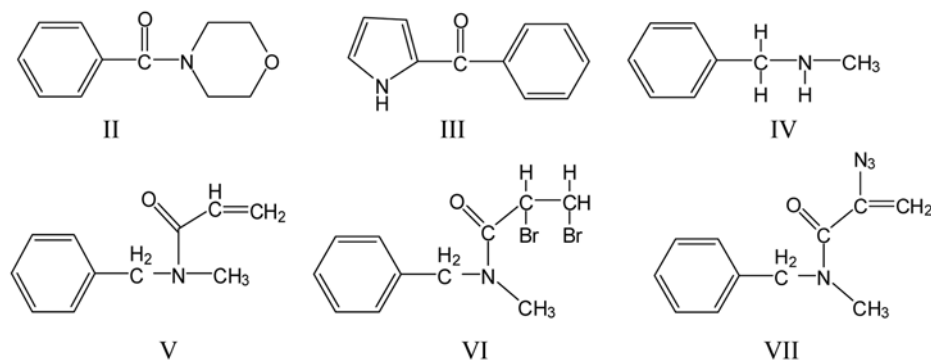


Рис. 4. Промежуточные продукты синтеза субстанции I.

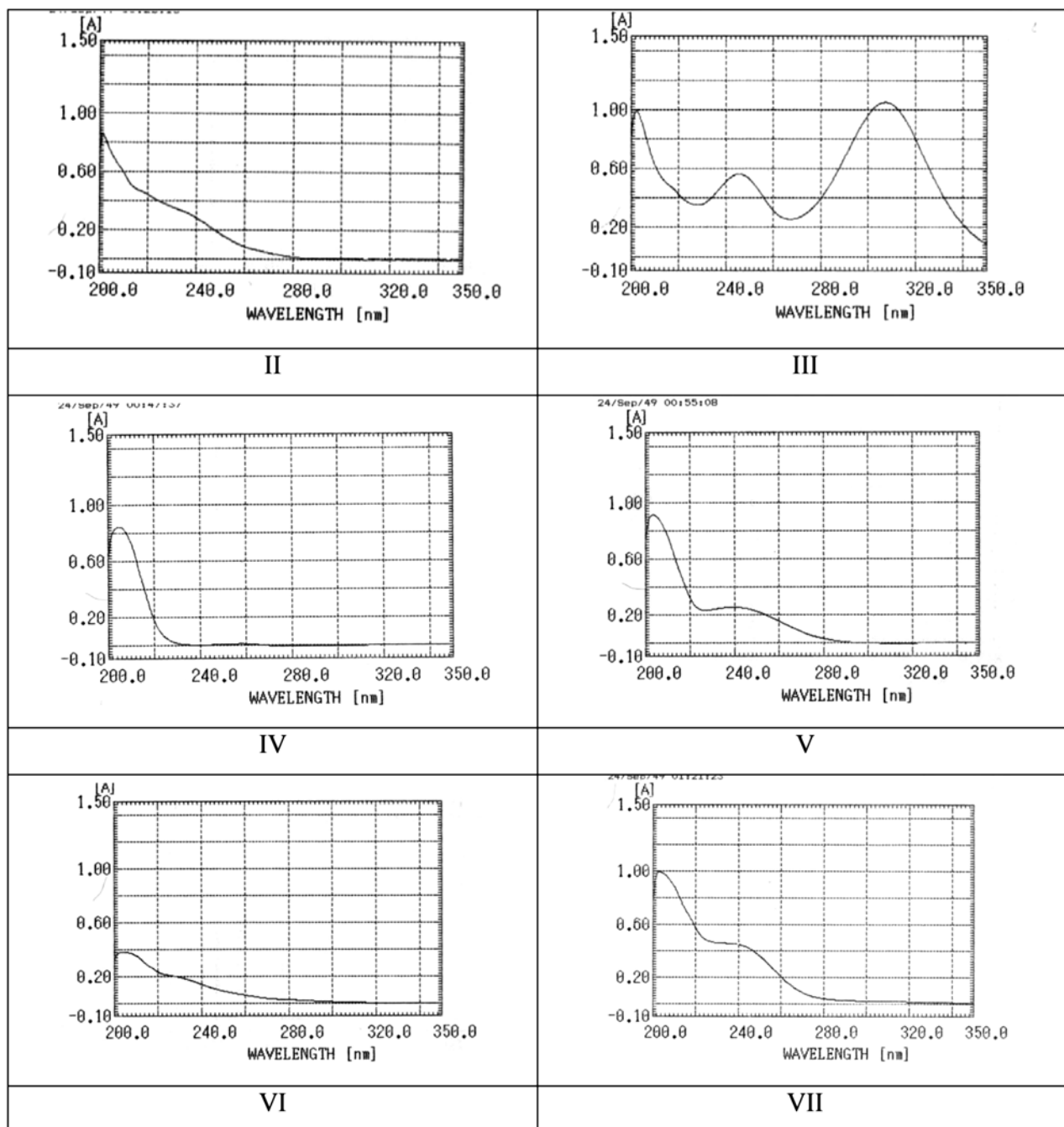


Рис. 5. УФ-спектры растворов технологических примесей субстанции I в этаноле: II (0,010 мг/мл); III (0,012 мг/мл); IV (0,012 мг/мл); V (0,010 мг/мл); VI (0,010 мг/мл); VII (0,015 мг/мл).

ческий, скорость потока подвижной фазы — 1 мл/мин, температура колонки комнатная, объем пробы 20 мкл.

С целью выбора аналитической длины волны нами получены УФ-спектры растворов свидетелей технологических примесей в этаноле (рис. 5). На основании анализа спектров была выбрана аналитическая длина волны — 210 нм.

В указанных условиях относительное время удерживания примесей II, III, IV, V, VI, VII составляло около 0,19; 0,28; 0,17; 0,24; 0,41 и 0,33 соответственно. Время удерживания I составляло около 10,2 мин (рис. 6).

Как видно из рис. 6, разделение технологических примесей IV и II было неполным, однако достичь лучших результатов при изменении соотношения компонентов подвижной фазы и изменения pH буферного раствора не удалось. Поскольку дальнейшие исследования показали, что содержание примесей со временем удерживания, соответствующим времени удерживания свидетелей технологических примесей, в образцах субстанции незначительно, было принято решение проводить анализ серийных образцов субстанции в указанных выше условиях.

Была изучена линейная зависимость площади пика I, а также его технологических примесей от концен-

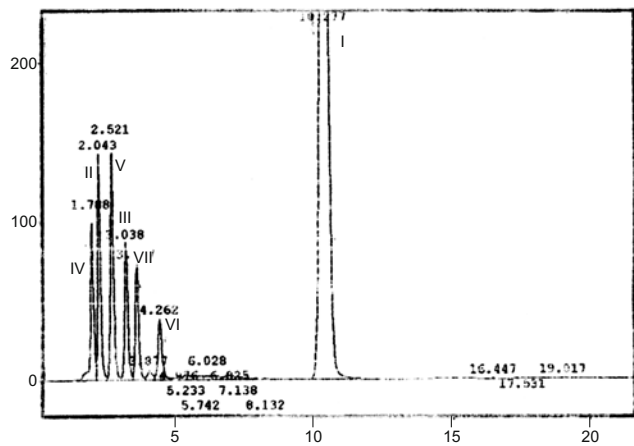


Рис. 6. Хроматограмма модельного раствора I и вероятных технологических примесей (концентрация I в испытуемом растворе 1 мг/мл, концентрация технологических примесей — 0,01 мг/мл).

трации их растворов. Исследуемые вещества растворяли в подвижной фазе. Показано, что линейная зависимость находится в пределах интервала концентраций от 0,0005 до 0,05 мг/мл (см. рис. 7). Коэффициенты корреляции для всех соединений составляли не менее 0,999.

Пределы обнаружения исследуемых соединений были определены экспериментально из соотношения сигнал/шум (3:1) и составили для I около 0,00002 мг/мл (0,0004 мкг), для примеси II — 0,00002 мг/мл (0,0004 мкг), для примеси III — 0,00003 мг/мл (0,0006 мкг), для примеси IV — 0,00004 мг/мл (0,0008 мкг), для примеси V — 0,00002 мг/мл (0,0004 мкг), для примеси VI — 0,00005 мг/мл (0,001 мкг), для примеси VII — 0,00003 мг/мл (0,0006 мкг).

В результате проведенных исследований для оценки хроматографической чистоты субстанции I выбра-

на рабочая концентрация испытуемых образцов — 1 мг/мл, концентрация раствора рабочего стандартного образца (PCO) I — 0,01 мг/мл (метод внешнего стандарта).

С помощью разработанной методики проведен анализ серийных образцов субстанции I.

Для приготовления испытуемого раствора около 0,02 г (точная навеска) субстанции I помещали в мерную колбу вместимостью 20 мл, прибавляли около 15 мл подвижной фазы, помещали раствор в ультразвуковую ванну на 15 мин, затем доводили объем раствора в мерной колбе до метки подвижной фазой, перемешивали (испытуемый раствор, концентрация I — 1 мг/мл).

Приготовление раствора PCO I: около 0,01 г (точная навеска) PCO I помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в подвижной фазе, доводили объем раствора в колбе до метки подвижной фазой, перемешивали. Полученный раствор в объеме 1 мл переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора в колбе до метки подвижной фазой, перемешивали (концентрация раствора PCO — 0,01 мг/мл).

Для приготовления раствора для проверки пригодности хроматографической системы около 0,02 г (точные навески) PCO I и N-бензилметиламина (B25606, Aldrich) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли около 80 мл подвижной фазы и помещали в ультразвуковую ванну на 15 мин. Затем доводили объем раствора в колбе тем же растворителем до метки, перемешивали. Полученный раствор в объеме 1 мл переносили в мерную колбу вместимостью 20 мл, доводили объем раствора в колбе подвижной фазой до метки, перемешивали.

Содержание посторонних примесей в % рассчитывали по формуле:

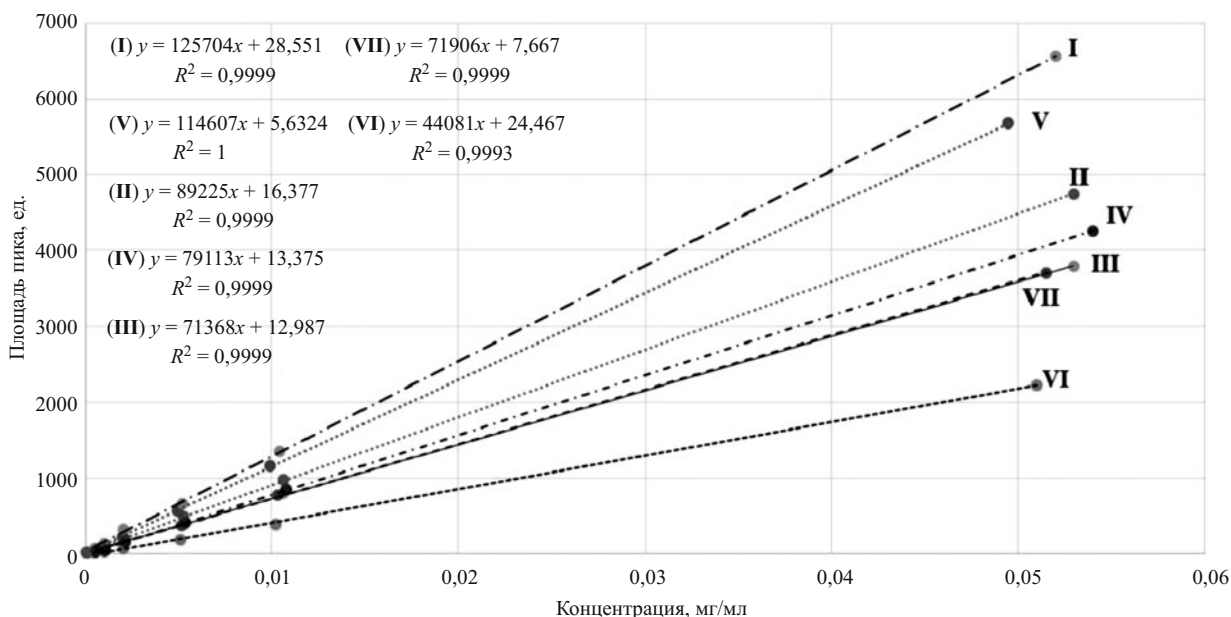


Рис. 7. Зависимость площади пика от концентрации испытуемых растворов I и технологических примесей II – VII.

$$X = \frac{S_x \cdot a_{ст} \cdot 20 \cdot 100}{S_{ст} \cdot a_{исп} \cdot 100 \cdot 10} = \frac{S_{исп} \cdot a_{ст} \cdot 2}{S_{ст} \cdot a_{исп}}$$

где S_x — площадь пика единичной примеси на хроматограмме испытуемого образца, ед.; $S_{ст}$ — площадь основного пика на хроматограмме раствора РСО, ед.; $a_{ст}$ — масса навески РСО, г; $a_{исп}$ — масса навески испытуемого образца I, г.

Хроматографическая система считается пригодной, если эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по I, составляет не менее 5500 теоретических тарелок, относительное стандартное отклонение площади пика I не превышает 2 %; фактор асимметрии пика I составляет не более 1,5 и относительное время удерживания бензилметиламина относительно времени удерживания I составляет $(0,17 \pm 0,01)$.

Результаты определения посторонних примесей в субстанции I представлены в табл. 1. Как видно из табл. 1, в серийных образцах субстанции I обнаружено до 15 примесей, содержание единичной примеси во всех образцах субстанции I не превышало 0,6 %, а сумма примесей составила не более 1 %.

Типичная хроматограмма субстанции I представлена на рис. 8.

На основании полученных экспериментальных данных в проект нормативной документации на субстанцию I включены следующие предварительные нормы: “Единичной примеси — не более 0,6 %, сумма примесей — не более 1,0 %”

Количественное определение субстанции I проведено методом определения общего азота по Кьельдалю.

Таблица 1
Содержание примесей в серийных образцах субстанции I

Относительное время удерживания	Содержание примесей, %			
	серия 070616	серия 260316	серия 170616	серия 290616
0,16	0,04	—	—	0,012
0,18	—	0,02	0,01	—
0,20	0,01	—	0,006	—
0,22	—	—	—	0,019
0,27	—	—	—	0,043
0,29	—	—	0,028	—
0,31	—	0,013	0,015	—
0,35	—	0,009	—	—
0,42	—	—	0,01	—
0,44	—	0,007	—	—
0,48	0,007	—	—	—
0,52	—	0,011	0,023	0,061
0,54	0,007	—	—	—
0,58	—	—	—	0,012
0,60	—	—	0,008	—
0,84	—	—	—	0,020
1,33	—	0,012	0,018	0,034
1,42	—	—	0,048	—
1,76	0,12	0,008	—	0,20
1,85	0,41	0,09	0,041	0,51
Сумма примесей	0,60	0,17	0,21	0,91

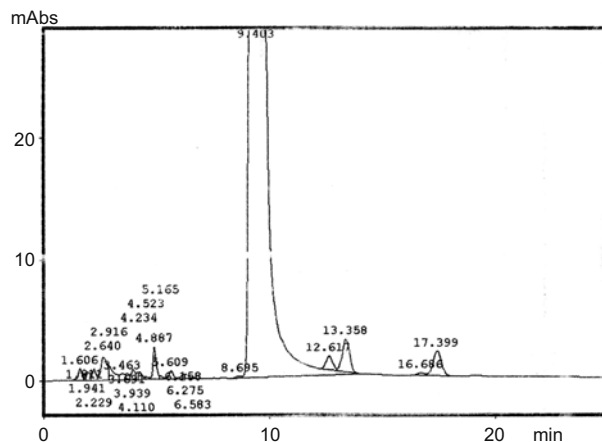


Рис. 8. Хроматограмма субстанции ГМЛ-1 серия 170616 (концентрация ГМЛ-1 в испытуемом растворе 1 мг/мл).

Около 0,15 г (точная навеска) препарата помещали в пробирку вместимостью 250 мл, прибавляли 1,0 г растертой смеси калия сульфата и меди сульфата (10:1), 0,07 г металлического селена и 7 мл концентрированной серной кислоты. Содержимое пробирки нагревали около 60 мин при температуре 400 °С до получения светло-зеленого раствора (конец минерализации). После охлаждения в пробирку осторожно приливали при перемешивании 20 мл воды, снова охлаждали и присоединяли пробирку к прибору для перегонки с водяным паром. В приемник перед началом отгонки наливали 20 мл 4 % раствора борной кислоты и прибавляли 5 капель смешанного индикатора.

Генерацию пара, нагрев пробирки и прибавление в пробирку 40 мл 30 % раствора натрия гидроксида проводили на приборе автоматически. В сборник собирали около 200 мл отгона, который титровали 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты до перехода окраски смешанного индикатора из зеленой в красно-фиолетовую.

Содержание ГМЛ-1 в субстанции (X, %) рассчитывали по формуле:

$$X\% = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 0,001401 \cdot K \cdot 341,41 \cdot 100}{m_{нав} \cdot 42},$$

где V_1 — объем кислоты хлористоводородной, израсходованный на титрование испытуемого раствора, мл; V_2 — объем кислоты хлористоводородной, израсходованной на титрование контрольного раствора, мл; K — поправочный коэффициент 0,1 М раствора кислоты хлористоводородной; 42 — молекулярная масса азота,

Таблица 2
Результаты количественного определения субстанции I

Номер серии	Результат анализа, %
070616	99,78
170616	99,36
260316	99,04
290616	98,77

входящего в состав I; 341,41 — молекулярная масса I; $m_{\text{нав}}$ — масса навески I, г.

С помощью разработанной методики проведен анализ серийных образцов субстанции I. Результаты количественного определения образцов субстанции в пересчете на содержание влаги представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, содержание I в субстанции во всех образцах составляло от 99,04 до 99,78 %.

Таким образом, нами были изучены основные физико-химические свойства серийных образцов субстанции I, показана возможность идентификации субстанции I с помощью методов ИК- и УФ-спектроскопии. Разработана методика определения посторонних примесей с помощью ВЭЖХ. Установлены следующие предварительные нормы: содержание единичной примеси в субстанции I не должно превышать 0,6 %, суммарное содержание примесей — 1 %.

Количественное определение субстанции I (метод Кьельдаля) нормируется в пределах от 98,5 до 100,5 %.

Разработанные методики будут включены в проект фармакопейной статьи предприятия на субстанцию I.

ЛИТЕРАТУРА

1. С. А. Ярков, Г. В. Мокров, Т. А. Гудашева и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **79**(1), 7 – 11 (2016).
2. С. Б. Середенин, Г. В. Мокров, Т. А. Гудашева и др., *1-Арилпирроло[1,2-а]пиазин-3-карбоксамиды с нейронсикхотропной активностью*, Патент РФ № 2572076 (2014).
3. С. V. Mokrov, O. A. Deeva, T. A. Gudasheva et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **23**(13), 3368 – 3378 (2015).
4. М. А. Яркова, П. Ю. Поварнина, Г. Мокров и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **80**(4), 3 – 7 (2017).

Поступила 19.02.18

STUDYING PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND DEVELOPING METHODS FOR THE ANALYSIS OF NEW ANXIOLYTIC AGENT GML-1

L. M. Gaevaya, L. N. Grushevskaya, M. S. Sergeeva, A. A. Illarionov, N. I. Avdyunina, B. M. Pyatin, F. S. Baiburtskii, and G. V. Mokrov

Zakusov State Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 125315 Russia

We have studied the physicochemical properties of the novel original anxiolytic substance GML-1, developed techniques for its analysis, and determined the main general pharmacopoeial quality characteristics. The properties of GML-1 were investigated using IR and UV spectroscopy techniques, high-performance liquid chromatography (HPLC) and Kjeldahl method.

Keywords: GML-1; anxiolytic; physicochemical properties; analysis; IR spectroscopy; UV spectroscopy; high-performance liquid chromatography (HPLC); Kjeldahl method.