

Г.В. Георгиевский

**РАЗРАБОТКА КОМПЛЕКСА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ МЕТОДИК,
ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ СОЗДАНИЕ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА
ОРИГИНАЛЬНЫХ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, ПРОИЗВОДНЫХ 1,2,4-ТРИАЗОЛА**

ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр», г. Харьков

Ключові слова: фізико-хімічні властивості, аналітичне забезпечення, похідні 1,2,4-тріазолу.

Ключевые слова: физико-химические свойства, аналитическое обеспечение, производные 1,2,4-триазола.

Key words: physical and chemical properties, analytical provision, 1,2,4-triazole derivatives.

Розроблено комплекс фізико-хімічних методик аналізу, що дозволяють провести систематичне забезпечення фармацевтичної розробки синтезу, технології та організації виробництва біологічно активних сполук, похідних 1,2,4-тріазолу. Розроблено також окремі теоретичні положення для створення лікарських препаратів на їх основі.

Разработан комплекс физико-химических методик анализа, позволяющих провести систематическое обеспечение фармацевтической разработки синтеза, технологии и организации производства биологически активных соединений, производных 1,2,4-триазола. Разработаны также теоретические предпосылки для создания лекарственных препаратов на их основе.

Complex of physical and chemical methods of analysis was worked out which permits to perform systematical supply of pharmaceutical development of the synthesis, technology and organization of manufacturing of the biologically active substances, 1,2,4-triazole derivatives. Theoretical preconditions of creation of novel drugs on their basis were worked out.

В настоящее время фармацевтический сектор Украины адаптирует законодательную и нормативную базу соответственно нормам Европейского Союза, в том числе и относительно регламентации производств и правил разработки лекарственных средств. Одним из таких документов является «Руководство по качеству. Лекарственные средства. Фармацевтическая разработка. Руководство 42-3.1:2004», введенное в действие приказом Министерства здравоохранения Украины от 31.12.2003 г. №637. Фармацевтическая разработка устанавливает рекомендации относительно структуры исследования и информации об этих исследованиях, которые включаются в регистрационное досье на лекарственное средство. Основой создания фармацевтической разработки являются результаты исследования физико-химических и биологических свойств действующих веществ и готовых лекарственных средств (ГЛС).

Необходимо отметить, что аналитическое обеспечение фармацевтической разработки базируется на комплексном применении методов анализа, заложенных в Государственную Фармакопею Украины (ГФУ), полностью гармонизированную с Европейской Фармакопеей.

Однако как ГФУ, так и Фармакопеи ведущих стран-производителей лекарственных средств (США, Китай, Индия, Япония и др.) не описывают методологическую организацию этих исследований. Потому при разработке лекарственных средств учитываются международные требования по созданию лекарственных средств (ЛС). Эти требования изложены в ранее приведенном Руководстве 42-3.1:2004.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Обобщение результатов изучения физико-химических свойств биологически активных соединений, производных 1,2,4-триазола, с целью обоснования синтеза, установления строения, чистоты и стабильности тиотриазолина, кардиотрила и препарата МТ.

Создание методик контроля качества ГЛС для разработки нормативно-аналитической и технологической документации для организации производства и регистрации лекарственных средств (фармацевтического досье).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования – производные 1,2,4-триазола, а также исходные продукты их синтеза (табл. 1).

Методы исследования: спектроскопия видимой области, УФ, ИК, ЯМР¹H, хромато-масс-спектрометрия; ТСХ, ГХ, ВЭЖХ, потенциометрия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Началом создания лекарственных средств является поиск биологически активного (действующего) вещества или смеси, комбинации веществ, предназначенных для использования в производстве, согласно его активным ингредиентам.

На этапе поиска новых биологически активных молекул с применением логико-структурного подхода с помощью программы PASS выбран ряд соединений.

В результате изучения 2 виртуальных структур производных 1,2,4-триазола сделан вывод, что базовым фармакофором является ядро 1,2,4-триазола. Из полученных 34 виртуальных структур подтверждены биологические и фармакологические свойства 11 соединений, 6 соединений отобраны для дальнейшего углубленного фармакологического исследования; показана возможность их синтеза [1,2].

Соединением, проявляющим гепатопротекторную и антиоксидантную активность, определен тиотриазолин (морфолина 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацетат), противоишемическую активность – кардиотрил (бромид 1-(β-фенилэтил)-4-(4-диметиламинобензилиденамино) 1,2,4-триазол) и МТ – [1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолин бромид] (табл. 1).



Таблица 1

Объекты исследования		
Вещество	М.м.	Формула
тиотриазолин	260,03	
3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоуксусная кислота (МТТА)	173,20	
3-метил-1,2,4-триазолил-5-тион(МТТ)	103,16	
N-ацетилтиосемикарбазид (АТСК)	117,18	
Тиосемикарбазид (ТСК)	91,15	
кардиотрил	400,32	
4-амино -1,2,4 –триазол	84,08	
диметиламинобензальдегид	149,19	
(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолия бромид (МТ)	268,25	

1. Оптические свойства

Спектры поглощения в УФ, видимой и ИК области спектра.

Анализ спектров поглощения производных 1,2,4-триазола в УФ и видимой области показал наличие следующих полос поглощения:

- максимумы: 202–208, 228–249, 311–315, 328–358 и 378–381 нм.

- минимумы: 241–224, 251–282 и 321–331 нм.

Так, тиотриазолин имеет максимум поглощения при 200 нм и наличие «плеча» при 233 нм, а исходный продукт 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоуксусная кислота имеет максимум при 253 нм и не поглощает в диапазоне «плеча» тиотриазолина при 233 нм (рис. 1), что использовано для количественного определения тиотриазолина в лекарственных формах и при проведении теста растворимости в таблетках тиотриазолина.

Отличительной особенностью спектра кардиотрила от 2 предыдущих соединений является наличие ярко

выраженного максимума при 382 нм, а также максимумов при 248 и 210 нм при «плече» 330–315 нм, а у п-диметиламинобензальдегида спектр характеризуется максимумом при 370 нм и 223 нм (рис. 2), что не позволяет проводить количественное определение кардиотрила при наличии его технологической примеси.

2. ИК спектры.

ИК спектры исследуемых соединений характеризуются следующей системой полос поглощения в области «отпечатков пальцев», которые могут использоваться для идентификации. Общим для всех соединений является присутствие групп CN ок. 1800 см⁻¹. Для тиотриазолина и кислоты характерны колебания при 1700–1635, 1622–1627 см⁻¹ и NH-триазольного кольца при 3200 и 3250 см⁻¹ соответственно. Для тиотриазолина «пальцы» солей иминов» (морфолина) – при 2100–2700 см⁻¹ и, в отличие от кислоты и морфолина, четко выражена полоса при 3200 см⁻¹ (рис. 3).

Условия хромато-масс-спектрофотометрических измерений приведены ниже.

Спектры ВЭЖХ сняты на Agilent 1100 Series LC\MSD SL с УФ-детектором\diode-array detector\ELSD (Evaporative Light Scattering Detector).

параметры: (CL15_FLH.M)

Колонка	Zorbax SB-C18 1.8 μm 4,6 × 15 mm Rapid Resolution cartridge (PN 821975–932)
Мобильная фаза	A – ацетонитрил/вода (95:5), 0,1% муравьиная кислота B – вода (0,1% муравьиная кислота)
Скорость	3 мл/мин 0 мин – 0% A 0,01 мин – 0% A
Градиент	1,5 мин – 100% A 1,7 мин – 100% A 1,71 мин – 0% A
Объем	0,5 μl
Способ ионизации	atmospheric pressure chemical ionization (APCI)
Шкала	m/z 80–1000

ЯМР-спектры и хромато-масс-спектры

Анализ ЯМР-спектров и хромато-масс-спектров (рис. 4–6) свидетельствует, что исследуемые соединения являются индивидуальными. При этом основным молекулярным ионом тиотриазолина, МТ и кардиотрила является 173; 189,2; 320,2 соответственно. ЯМР-спектры сняты на приборе Bruker Avance DRX – 500 при комнатной температуре. Для измерения применен датчик QNP (H-CPN).

Таким образом, базируясь на данных УФ, ИК, ЯМР и хромато-масс-спектрофотометрических характеристиках, а также с учетом данных элементарного анализа установлено строение тиотриазолина, МТ и кардиотрила, структурные формулы которых представлены в табл. 1.

Кислотно-основные свойства

Произведенные квантово-химические расчеты методом МНДО с анализом величин зарядов на атомах триазольного кольца, а также связанных с ним атомах, позволяющих су-

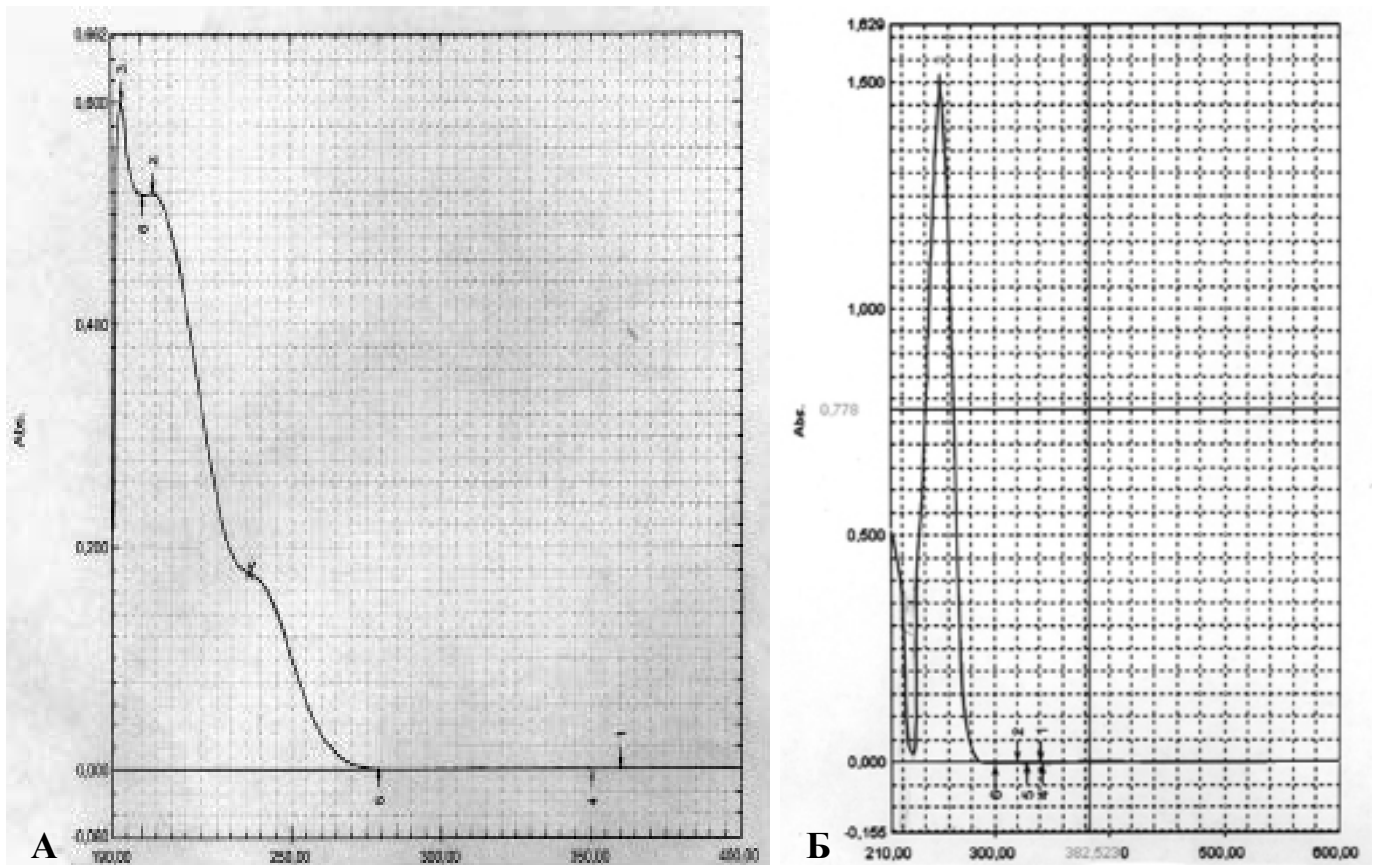


Рис. 1. УФ-спектр тиотриазолина (А) и 3-метил-1,2,4 триазолил-5-тиоуксусной кислоты (Б) в спирте.

дить об основных свойствах триазольного кольца и цифрах протонизации, показали, что производные 1,2,4-триазола должны обладать основными свойствами (за счет значительного отрицательного заряда на кольцевых атомах), и могут быть оттитрованы в кислых неводных растворителях [7].

Опираясь на полученные данные, проведено исследование основных свойств 1,2,4-триазола и проведен выбор оптимальных условий кислотно-основного титрования по величине pK_t – показателя константы титрования (табл. 2). Методики количественного определения субстанций тиотриазолина, МТ и кардиотрила введены в нормативно-аналитическую документацию.

Расчет pK веществ проведен методом потенциометрического титрования с системой электродов стеклянный-каломельный с применением автоматического титратора 702SET METTitrino фирмы «Metrohm» (Швейцария) по модифицированному уравнению Гендерсона. В качестве стандартного вещества взят антипирин с pK_a в уксусной кислоте 8,35, в уксусном ангидриде – 9,6 [8].

Хроматографические свойства

Тонкослойная хроматография (ТСХ)

Условия хроматографирования и результаты исследований приведены в таблице 3.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Подвижность тиотриазолина совместно с возможными его технологическими примесями определена на хро-

матографе «Милихром-4» со спектрофотометрическим детектором в прямом режиме при следующих условиях: колонка 2x80 мм, заполненная сорбентом «Silasorb 600» зернением 7 мкм. Подвижная фаза ацетонитрил – 0,5 М, водный фосфатный буфер $pH = 4,0$ (30:70). Объем пробы – 5–10 мкл, концентрация растворов – 1 мг/мл, детектирование при 200 с и 360 нм. Хроматографические характеристики приведены в табл. 4.

В данных условиях хроматографируемый тиотриазолин идет в виде свободной кислоты – МТТА и хорошо отделяется от технологических примесей МТТ и АТСК.

В кардиотриле определены сопутствующие примеси: бромид β -фенилэтил-4-амино-1,2,4-триазолия и 4-диметиламинобензальдегид, которые могут попасть в препарат как в ходе синтеза, так и при нарушении условий хранения (продукты разложения). Определение проводили методом ВЭЖХ [9].

Иследуемый раствор. 80 мг кардиотрила растворяли в 40 мл подвижной фазы и доводили объем раствора той же самой подвижной фазой до 50 мл.

Раствор сравнения (а). 160 мг ФСО ГФУ кардиотрила растворяли в 40 мл подвижной фазы и доводили объем раствора той же самой подвижной фазой до 50 мл.

Раствор сравнения (б). 16 мг ФСО ГФУ бромид 1-(β -фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолия и 16 мг ФСО ГФУ 4-диметиламинобензальдегида растворяли в 80 мл подвижной фазы и доводили объем раствора той же самой

Величины $R_{\text{К}}$ тиотриазолина, кардиотрила, а также веществ, применяемых в их синтезе

Вещество	Растворитель			
	уксусная кислота	уксусная кислота + ртути (II) ацетат	уксусный ангидрид	уксусный ангидрид +ртути (II) ацетат
кардиотрил	9.146	5.77	8.58	7.21
	-	9.54	11.39	9.24
1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолия бромид	не титруется	6.99	10.30	9.33
аминотриазол	7.99	-	8.12	-
п-диметиламинобензальдегид	7.60	-	8.41	-
тиотриазолин	5.52	-	6.51	-
	7.64	-	8.64	-
морфолин	8.70	-	6.34	-
3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоуксусная кислота	6.88	-	8.71	-

Таблица 3

 R_f тиотриазолина, кардиотрила и их сопутствующих примесей

№	Вещество	Система	
		метанол-вода (3:7)	ацетон-вода (50:2)
		Пластика	
		Sorbfil	Плазмохром
1.	тиосемикарбозид	0.68	0.71
2.	ацетилтиосемикарбозид	0.54	0.84
3.	3-метил-1,2,4-триазолил-5-тион	0.63	0.86
4.	тиотриазолин	0	0
5.	кардиотрил	0.68	0.77
6.	бромид-1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолий	0.2	0.14
7.	4-аминотриазол	0.18	0.18
8.	диметиламинобензальдегид	0.04	0.05

Примечание:

Исследуемые вещества наносили в виде 0,5 % растворов в 96% спирте в количестве 10–30 мкг; проявитель – пары йода.

Определяемый минимум вещества для соединений № 1–4 составляет 0,05 мкг, для соединений № 5–8 – от 0,06 до 0,02 мкг.

подвижной фазой до 100 мл. 10 мл полученного раствора доводили подвижной фазой до объема 50 мл.

Раствор сравнения (с). 25 мл раствора сравнения (а) и 12,5 мл раствора сравнения (б) доводили подвижной фазой до объема 50 мл.

Хроматографирование проводили на жидкостном хроматографе с УФ-детектором при следующих условиях:

- колонка «Hypersil ODS C18» размером 4,6 × 250 мм с размером частиц 5 мкм;

- подвижная фаза: смесь ацетонитрила с фосфатным буферным раствором (28:72);

- фосфатный буферный раствор: 3,6 г динатрия гидрофосфата и 3,4 г тетрабутиламмония гидросульфата растворяли в 900 мл воды. Устанавливали pH 2,5–3,0 с помощью кислоты фосфорной и водой доводили объем раствора до 1000 мл;

- скорость подвижной фазы 1,3 мл/мин;

Таблица 4

Хроматографические характеристики тиотриазолина

Соединение	Объем удерживания мкл	Коэффициенты емкости, К
Тиотриазолин	249	1,72
МТТА	249	1,72
АТСК	215	1,48
МТТ	210	1,45
Кардиотрил	474	3,27

- детектирование при длине волны 220 нм.

Попеременно хроматографировали по 2 мкл исследуемого раствора и раствора сравнения (с), получая не менее 3 хроматограмм.

Хроматограммы, полученные согласно вышеприведенным условиям, свидетельствуют (рис. 7), что кардиотрил и его возможные примеси количественно разделены. Это позволило разработать методику сравнительного определения примесей, сумма которых не должна превышать 1%. Разработанные методики применяют при синтезе кардиотрила и для определения его доброкачественности [9].

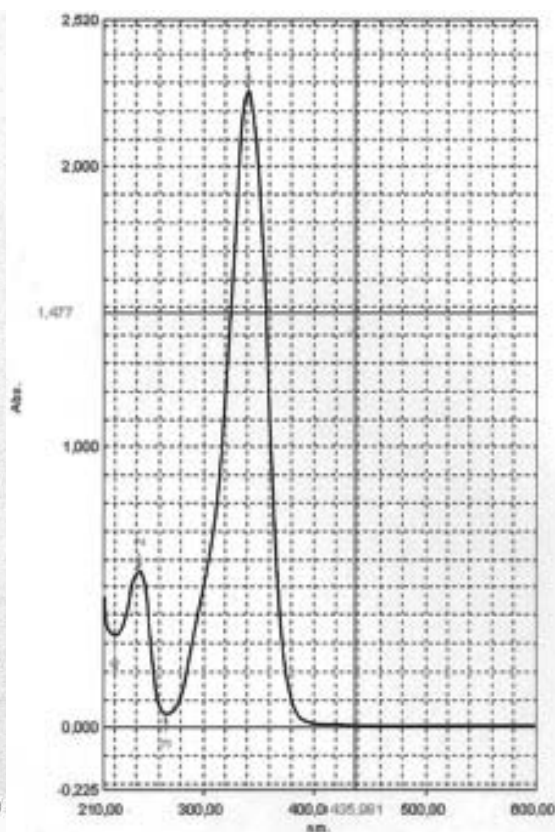
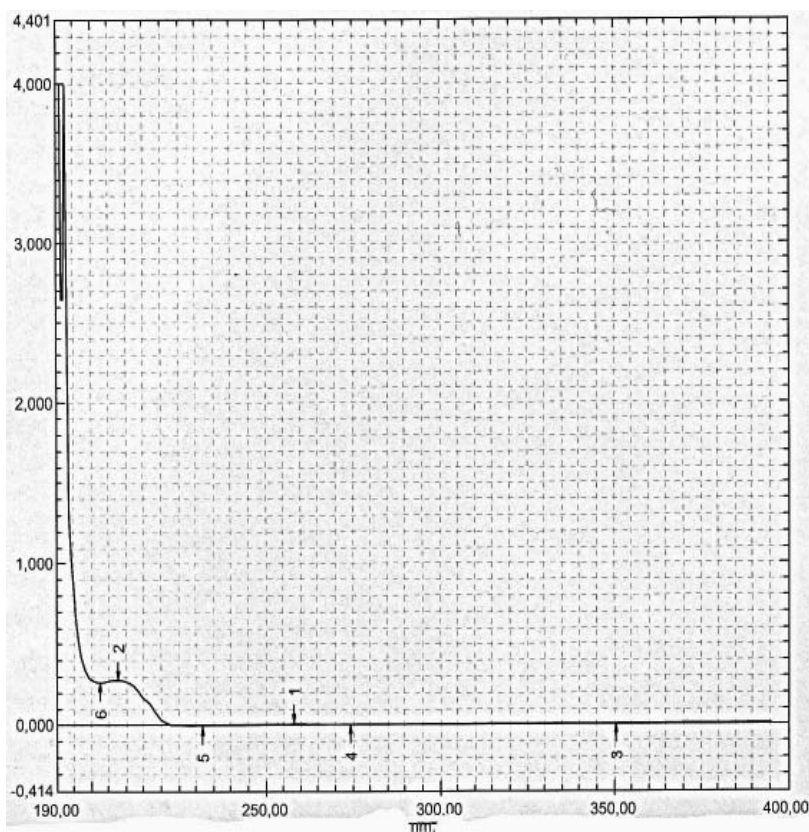
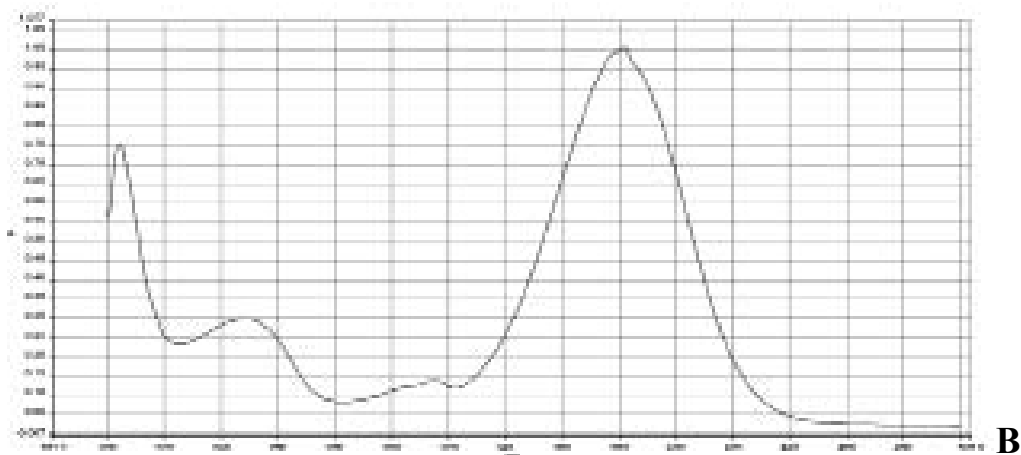
Идентификация остаточных растворителей и контроль их количества методом газовой хроматографии

Контроль остаточных количеств растворителей проведен в соответствии с требованием ГФУ (статья 2.4.24) методом газовой хроматографии в варианте абсолютной калибровки.

Так, например, при синтезе тиотриазолина используют разные летучие органические растворители: монохлоруксусную кислоту, изопропанол, этанол, ацетон, бензол. Это поставило задачу контроля их содержания в субстанции. Такой контроль осуществлен методом газовой хроматографии в варианте абсолютной калибровки на хроматографе с пламенно-ионизационным детектором на хроматографе «Миллихром-4».

Для определения этанола, изопропанола, ацетона и бензола использовалась колонка с Porapak Q-S, а монохлоруксусной кислоты – колонка с Хроматоном N-AWc 7% полиэтиленгликоля 1500.

В субстанции тиотриазолина не обнаружена хлоруксусная кислота, уксусная кислота, изопропанол, бензол, этанол. Обнаружен ацетон, используемый для сушки субстанции на послед-



Г

Д

Рис. 2. УФ-спектр кардиотрила (В), МТ (Г) и п-диметиламинобензальдегида (Д) в спирте.

ней стадии производства. Содержание ацетона в субстанции тиотриазолина регламентировано на уровне не более 0,1%.

Исследование стабильности тиотриазолина и кардиотрила

Как уже было отмечено, выполнение фармацевтической разработки требует приведения данных о стабильности лекарственной субстанции. Следовательно, и при обосновании состава ГЛС необходимы данные о стабильности, которые в свою очередь предусматривают влияние pH, растворителя, температурных воздействий, света и др. Поэтому при исследовании стабильности необходимо применять ускоренные испытания, спланированные таким образом, чтобы увеличить скорость химического разложения действующего вещества или ЛС посредством создания

особенно неблагоприятных условий, которые в деталях могут предсказать оптимальные условия как создания лекарственного средства, так и его хранения (руководство по качеству «Лекарственные средства, испытания стабильности» 42.-3,3:2004).

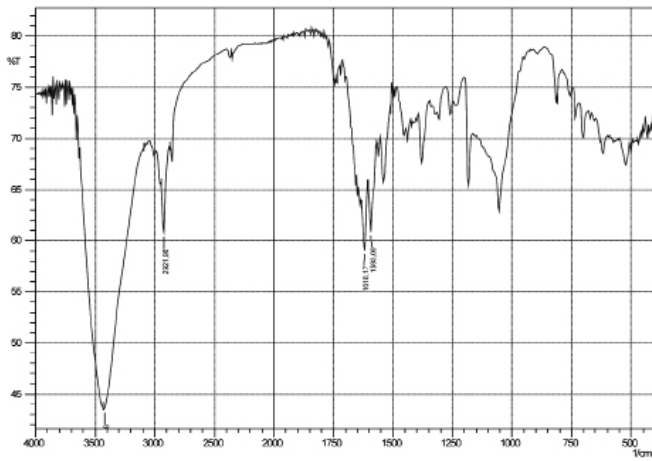
Исследование стабильности субстанций проведено с использованием различных методов их разложения (Директива ICH Q1B).

Стрессовое разложение субстанции проводят с использованием различных методов ее разложения:

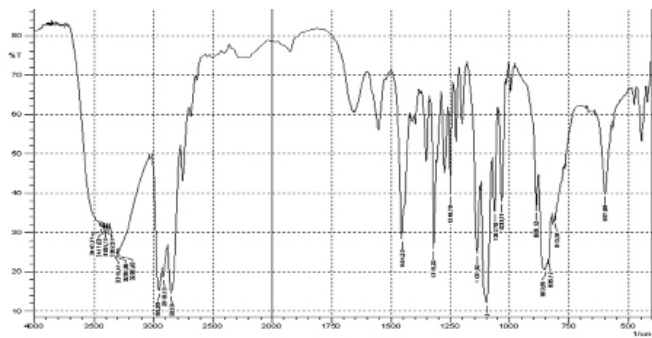
- 1) облучение светом, чаще всего ультрафиолетовым (согласно требованиям руководства ICH Q1B);
- 2) кислотный гидролиз (0,1 М раствор HCl);



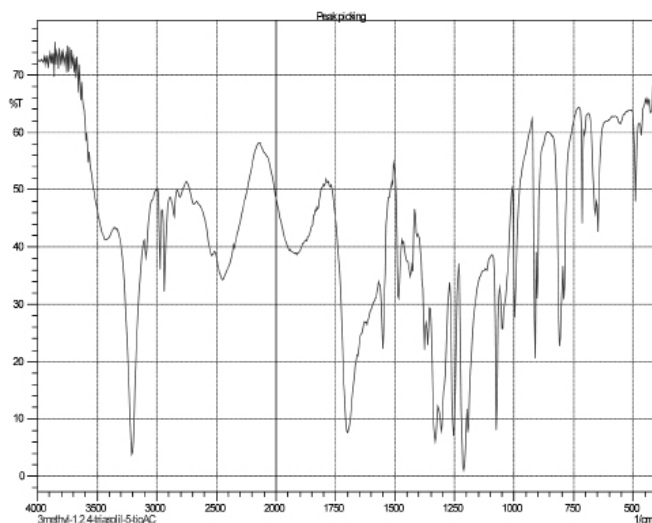
ИК спектры



А



Б



В

Рис. 3. ИК спектры (А. Тиотриазолин; Б. Морфолин; В. 3-метил-1,2,4-триазолил тиоуксусная кислота).

- 3) щелочной гидролиз (0,1 М раствор NaOH);
- 4) гидролиз водных растворов и/или окислительное разложение (3% раствор H₂O₂).

Разложение нагреванием или воздействием солнечного света проводят в течение 10 сут., в то время как для гидролиза и окислительных процессов необходима температура около 100°C и время от 0,5 до 4 ч [3,4,7].

При исследовании стабильности субстанции изучены следующие факторы:

- 1) облучение раствора субстанции жестким ультрафиолетовым светом (УФ-облучение светом ртутной лампы);
- 2) кислотный гидролиз 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной;
- 3) окислительное разложение 3% раствором водорода пероксида.

Для этого приготовлен раствор испытуемой субстанции в смеси ацетонитрил–вода (1:1) с концентрацией 1 мкг/мл. Полученный раствор хроматографировали и использовали как раствор сравнения.

10 мл раствора испытуемой субстанции помещали в кварцевую чашку, которую затем помещали на расстоянии 20 см от источника излучения (ртутная лампа) и выдерживали под воздействием УФ-света в течение 1,5 ч. После облучения раствор при помощи смеси ацетонитрил–вода (1:1) количественно переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора той же смесью растворителей до метки, перемешивали и хроматографировали.

10 мл раствора испытуемой субстанции помещали в сосуд вместимостью 20 мл, прибавляли 1 мл 1 М раствора кислоты хлористоводородной и выдерживали при температуре 70±5°C в течение 3 ч. После гидролиза раствор при помощи смеси ацетонитрил–вода (1:1) количественно переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора той же смесью растворителей до метки, перемешивали и хроматографировали.

10 мл раствора испытуемой субстанции помещали в сосуд вместимостью 20 мл, прибавляли 1 мл 30% раствора водорода пероксида и выдерживали при температуре 70±5°C в течение 3 ч. После окислительного разложения раствор при помощи смеси ацетонитрил–вода (1:1) количественно переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора той же смесью растворителей до метки, перемешивали и хроматографировали; оценивали полученные хроматограммы и делали вывод о стабильности субстанции и селективности методики определения примесей.

Для приготовления подвижных фаз использовали лития дигидрофосфат, кислоту фосфорную концентрированную, ацетонитрил для хроматографии фирмы «Fluka Chemie» (Buchs, Швейцария).

Хроматографирование проведено на жидкостном хроматографе Hewlett Packard 1050 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), снабженном интегратором серии 3395. Хроматографические колонки Kromasil C18 (250 мм×4,6 мм, 5 мкм) и Resolve C18 (300 мм×4,6 мм, 5 мкм) производства фирмы «Waters», США. Разделение проводили при температуре 30±0,1°C, скорость подвижной фазы – 1 мл/мин, объем вводимой пробы – 10 мкл.

Значение pH подвижных фаз контролировалось с помощью pH-метра Beckman Ф-200 pH meter (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA).

Стабильность тиотриазолина

Выбор условий хроматографирования. Для выбора условий хроматографирования использованы расчетные данные о ве-

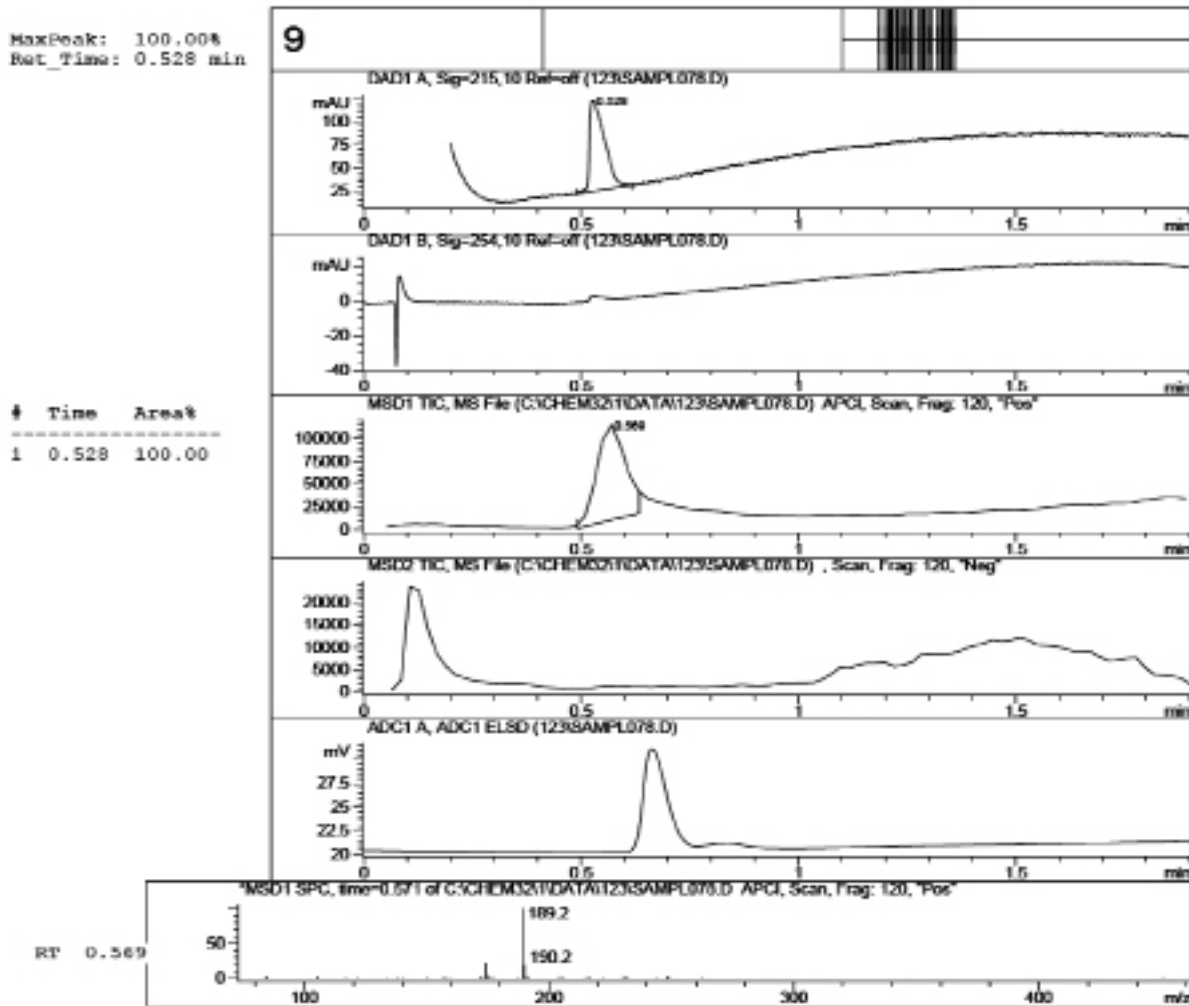


Рис. 4. Хромато-масс спектр тиотриазолина (Тиотриазолин – индивидуальное вещество. Спектр ЯМР ^1H : CH_3 – 2,25 м.д., SCH_2 – 3,6 м.д., NCH_2 – 2,95 м.д., OCH_2 – 3,68 м.д.).

личинах коэффициента распределения октанол–вода ($\log P_{o/w}$, гидрофобность вещества), константах протонизации, а также данные специальной литературы [17], которые свидетельствуют, что при хроматографировании азотсодержащих соединений чаще всего используют кислые подвижные фазы.

При помощи программы ACD/Labs (ACD/Labs 10 [18]) рассчитаны величины гидрофобности, которые для тиотриазолина (3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоуксусной кислоты) составили $\log P=0,45$, $c\log P=-0,842$ соответственно. Исходя из полученных величин можно сделать вывод, что тиотриазолин должен удерживаться на обращенно-фазовых сорбентах типа C18 с использованием кислых подвижных фаз с низким (до 10%) содержанием органического модификатора. Кроме того, наличие карбонильной группы приводит к выводу, что подвижная фаза должна быть кислой (pH менее 3).

Предварительный эксперимент показал, что приемлемого и воспроизводимого удерживания (около 10 мин) тиотриазолина можно добиться с использованием подвижной фазы состава ацетонитрил–вода, доведенной до pH=2,0 кислотой фосфорной концентрированной в объемном соотношении 2:98.

В указанных условиях наблюдается хорошее разделение

пиков тиотриазолина с одним из полупродуктов синтеза – 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тионом (рис. 8).

Как видно из рис. 8, на хроматограмме наблюдается еще один пик примеси со временем удерживания около 18 мин (T_2); возможно это тиотриазолин-димер.

На хроматограмме раствора тиотриазолина, который впоследствии будет подвергнут различным стрессовым воздействиям, наблюдается наличие примеси 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиона (около 0,2%) и димера (около 0,2%). Водно-ацетонитрильный раствор тиотриазолина достаточно устойчив, и после 8 ч (хранился в защищенном от света месте) увеличение содержания примесей не отмечено.

Кислотный гидролиз. При кислотном гидролизе наблюдается значительное увеличение примеси (T_{imp}) со временем выхода около 18 мин, которая может быть димером тиотриазолина. Содержание примеси составляет 0,6% (метод внутренней нормировки).

Разложение субстанции под действием УФ-света. Субстанция достаточно чувствительна к воздействию света: наблюдается значительное увеличение содержания примеси 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиона (около 7,8%). Содержание

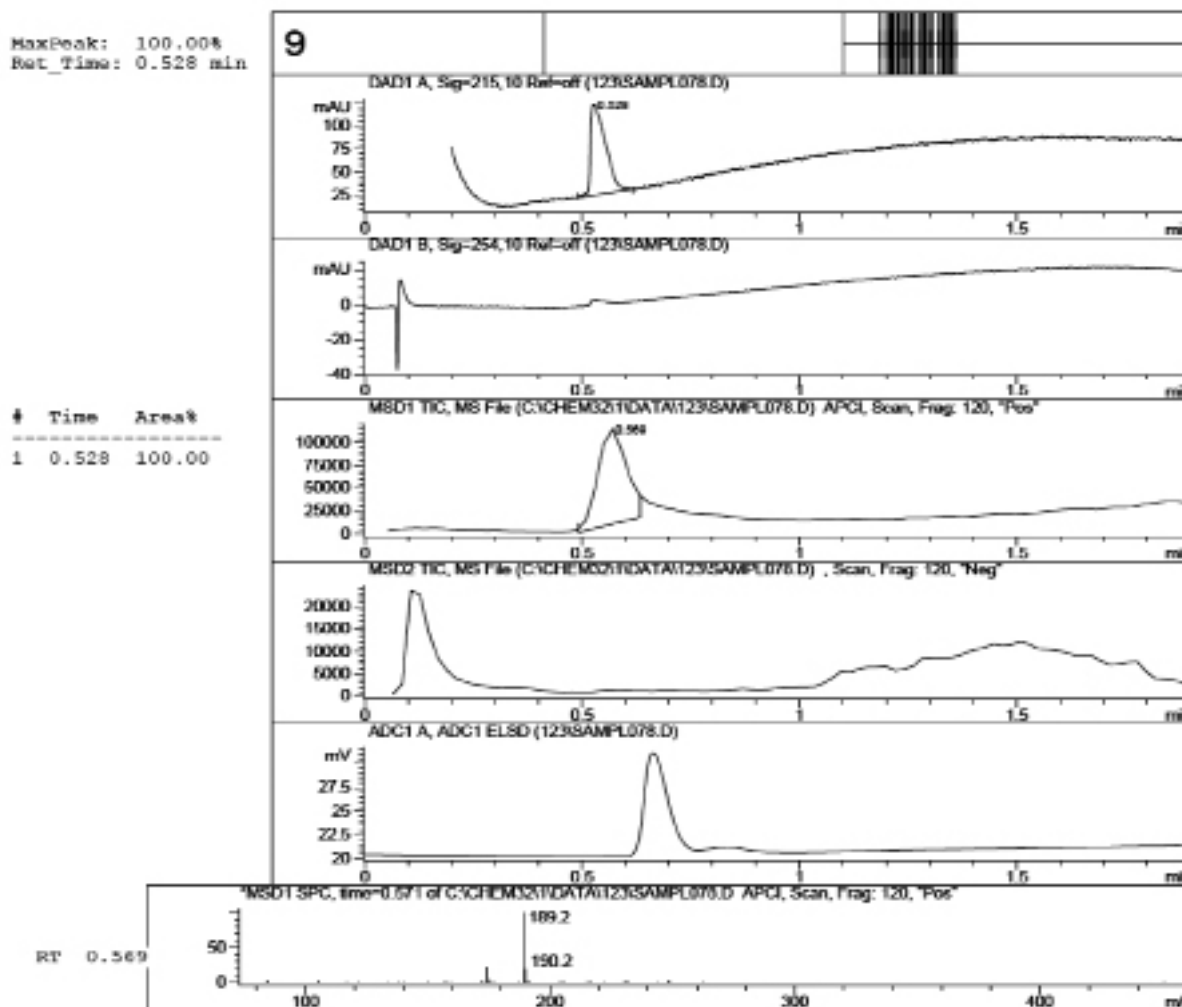


Рис. 5. Хромато-масс спектр (β-фенилэтил)4-амино-1,2,4-триазиолила ((β-фенилэтил)4-амино-1,2,4-триазиолил – индивидуальное вещество. Спектр ЯМР ¹H: CH₂-Ph – 3,19 м.д., N-CH₂ – 4,63 м.д., NH₂ – 7,04 м.д., Ph – 7,2–7,3 м.д., CH – 9,2 м.д., CH – 10,24 м.д.).

примеси димера практически не изменяется (около 0,3%), но при этом наблюдается образование еще ряда примесей, содержание которых составляет 1,4; 0,3; 0,4; 0,4 %, соответственно (метод внутренней нормировки).

Следовательно, тиотриазолин чувствителен к воздействию света; как субстанцию, так и лекарственную форму необходимо хранить в контейнере из темного стекла в защищенном от света месте.

Окислительное разложение. Субстанция достаточно чувствительна к окислителям: наблюдается значительное увеличение содержания примеси 3-метил-1,2,4-триазиолил-5-тиона (около 41%). Содержание примеси димера практически не изменяется (около 0,2%), но при этом наблюдается образование еще ряда примесей, содержание которых составляет от 0,1% до 0,2% (метод внутренней нормировки).

Следовательно, тиотриазолин чувствителен к окислителям, а лекарственная форма должна содержать в своем составе антиоксидант.

Исходя из приведенных хроматограмм, также можно сделать вывод, что полупродукты синтеза и примеси, которые могут образоваться при хранении (результаты стрессового

разложения), могут быть отделены от основного вещества – тиотриазолина – и количественно оценены (табл. 5).

Методика определения содержания примесей в тиотриазолине.

Приготовление испытуемого раствора. 0,025 г (точная навеска) тиотриазолина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в смеси ацетонитрил–вода (1:1), доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор сравнения: 0,05 г (точная навеска) 3-метил-1,2,4-триазиолил-5-тиона и 0,05 г (точная навеска) тиотриазолина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в смеси ацетонитрил–вода (1:1), доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора смесью ацетонитрил–вода (1:10) до метки и перемешивают (0,5% примеси).

По 20 мкл испытуемого раствора, раствора сравнения и смеси ацетонитрил–вода (1:1) хроматографируют, получая не менее 3 хроматограмм для каждого раствора в следующих условиях:

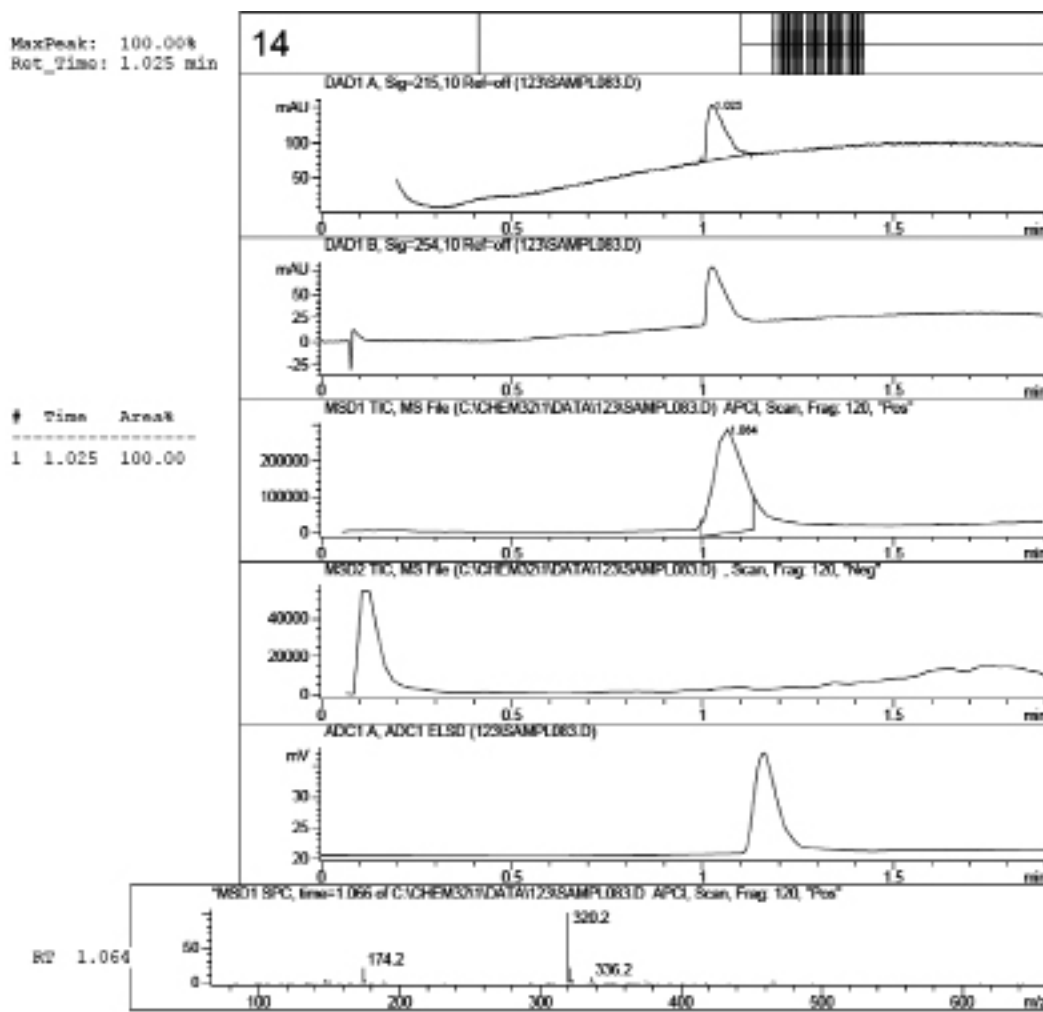


Рис. 6. Хромато-масс спектр кардиотрила (кардиотрил – индивидуальное вещество. Спектр ЯМР ^1H : CH_3 – 3,06 м.д., CH_2 -Ph – 3,23 м.д., N- CH_2 – 4,64 м.д., p-Ph – 7,2–7,35 м.д., p-Ph – 6,84 и 7,7 м.д., CH – 8,94 м.д., CH – 9,75 м.д., CH – 10,64 м.д.)

- колонка Resolv C18, размером $300 \times 4,6$ мм, заполненная сорбентом с размером частиц 5 мкм или аналогичная;
- подвижная фаза: смесь ацетонитрил–вода, доведенная до $\text{pH}=2,0$ кислотой фосфорной концентрированной (потенциометрически) (2:98), дегазированная любым удобным способом;
- скорость подвижной фазы – 1 мл/мин;
- температура колонки – 30°C ;
- длина волны детектирования – 220 нм.

Время хроматографирования должно быть в 3 раза больше времени удерживания основного пика.

На хроматограмме раствора сравнения порядок выхода пиков следующий: 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тион, тиотриазолин.

На хроматограмме испытуемого раствора площадь пика 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиона не должна превышать площади пика 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиона на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,5%).

На хроматограмме испытуемого раствора площади дополнительных пиков, кроме пика 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиона и пиков, времена удерживания которых совпадают со временами удерживания пиков на хроматограмме смеси ацетонитрил–вода (1:1), не должна превышать площади пика тиотриазолина на хроматограмме раствора сравнения (не более

0,5% каждой примеси). Суммарное содержание неидентифицированных примесей не должно превышать 1%.

Стабильность Кардиотрила.

Выбор условий хроматографирования.

Использование программы ACD Labs для расчета параметров гидрофобности заряженных соединений затруднительно, т. к. общие (табличные) критерии расчета гидрофобности в этом случае применить нельзя. Упрощенный критерий гидрофобности Шатца [19] в данном случае не применим по той же причине. Следовательно, выбрать условия хроматографирования можно только экспериментально.

Азотистые основания чаще всего хроматографируют с использованием кислых подвижных фаз с добавками компонентов, которые препятствуют взаимодействиям с остаточными силанолами подвижной фазы.

В нашем случае для выбора условий хроматографирования использовали буферный раствор, содержащий лития фосфат, и градиентное элюирование с использованием ацетонитрила (от 5 до 70%).

Хроматограмма, полученная в условиях градиентного элюирования, приведена на рис. 9.

Видно, что режим градиентного элюирования позволяет раз-

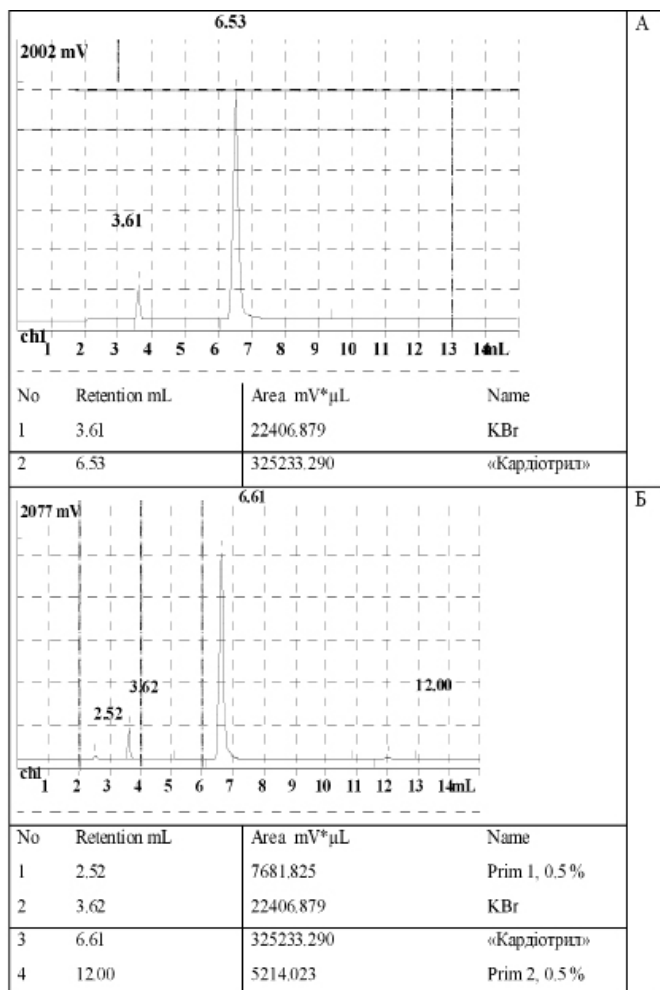


Рис. 7. Типовые хроматограммы определения сопутствующих примесей в кардиотриле.

Примечания: хроматограммы образцов «Кардиотрила»:

А – стандартный образец «Кардиотрила»;

Б – образец «Кардиотрила», который содержит примеси (Prim 1 – бромид β-фенилэтил-4-амино-1,2,4-триазолия;

Prim 2 – 4-диметиламинобензальдегид).

делить кардиотрил и полупродукты его синтеза, однако время анализа в данном случае достаточно велико. Для уменьшения времени анализа проведен эксперимент по выбору состава подвижной фазы в режиме изократического элюирования. При использовании подвижной фазы состава ацетонитрил-буферный раствор (45–50% об/об) удалось разделить примеси и уменьшить время анализа. На рис. 10 приведена хроматограмма, полученная в режиме изократического элюирования: наблюдается хорошее разделение пиков кардиотрила с полупродуктами синтеза – 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолием бромидом и п-диметиламинобензальдегидом.

На хроматограмме наблюдается наличие незначительного количества примеси п-диметиламинобензальдегида (около 0,03%) и 2 неизвестных примесей (0,09% и 0,05% соответственно). Водно-ацетонитрильный раствор кардиотрила достаточно устойчив, и после 6 ч хранения в защищенном от света месте увеличения содержания примесей для данного раствора не наблюдалось. Расчеты велись без учета пика бромид-иона.

Кислотный гидролиз. При кислотном гидролизе на-

блюдается значительное разложение кардиотрила с образованием 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолия и п-диметиламинобензальдегида. Кроме того, на хроматограмме можно отметить наличие еще нескольких неизвестных примесей, содержание которых составляет от 0,1% до 0,2% (метод внутренней нормировки).

Разложение субстанции под действием УФ-света. Субстанция чувствительна к воздействию света: наблюдается незначительное увеличение содержания примесей 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолия и п-диметиламинобензальдегида (0,18 и 0,11% соответственно). Кроме того, под воздействием ультрафиолетового света кардиотрил окисляется и образуется ряд примесей, содержание 2 из которых достаточно большое – 2,81 и 3,35% соответственно (метод внутренней нормировки).

Следовательно, кардиотрил чувствителен к воздействию света; как субстанцию, так и лекарственную форму, необходимо хранить в контейнере из темного стекла в защищенном от света месте.

Окислительное разложение. Субстанция также чувствительна к окислителям: наблюдается образование продукта окисления кардиотрила (содержание около 0,9%). Содержание других примесей, в том числе и 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолия незначительно и составляет 0,03% и от 0,02 до 0,2% других примесей (метод внутренней нормировки).

Следовательно, кардиотрил чувствителен к окислителям, и лекарственная форма должна содержать в своем составе антиоксидант.

Исходя из приведенных хроматограмм, также можно сделать вывод, что полупродукты синтеза и примеси, образующиеся при хранении (результаты стрессового разложения) могут быть отделены от основного вещества (кардиотрила) и количественно оценены (табл. 6).

Методика определения примесей в кардиотриле.

Приготовление испытуемого раствора: 0,025 г (точная навеска) кардиотрила помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в смеси ацетонитрил–вода (1:1), доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор сравнения: 0,05 г (точная навеска) 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолия бромид, 0,05 г (точная навеска) п-диметиламинобензальдегида и 0,05 г (точная навеска) кардиотрила помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в смеси ацетонитрил–вода (1:1), доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора смесью ацетонитрил–вода (1:1) до метки и перемешивают (0,5% примеси).

Приготовление буферного раствора: в мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 5,2 г лития дигидрофосфата, растворяют в 800 мл воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Доводят pH полученного раствора до 3,0 кислотой фосфорной концентрированной (потенциометрически).

По 30 мкл испытуемого раствора, раствора сравнения и

Таблица 5

Результаты стрессового разложения тиотриазолина

Условия стрессового разложения	Количественное содержание основного вещества тиотриазолина, %	Массовый баланс, % (содержание основного вещества, % + содержание продуктов деградации и примесей, %)
без разложения	99.6	99.9
облучение раствора субстанции жестким ультрафиолетовым светом (20 см, 1.5 ч)	89.4	99.5
кислотный гидролиз 0.1 М раствором HCl (70 °С; 3 ч)	99.4	99.9
окислительное разложение 3 % раствором H ₂ O ₂ (70 °С; 3 ч)	57.7	99.1

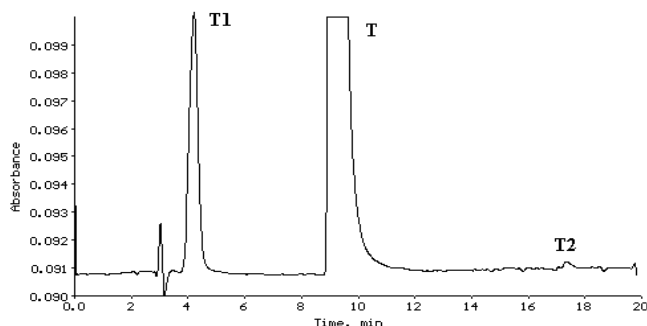


Рис. 8. Разделение тиотриазолина (Т) с 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тионом (Т1).

Таблица 6

Результаты стрессового разложения кардиотрила

Условия стрессового разложения	Количественное содержание основного вещества кардиотрила, %	Массовый баланс, % (содержание основного вещества, % + содержание продуктов деградации и примесей, %)
без разложения	99.7	99.8
облучение раствора субстанции жестким ультрафиолетовым светом (20 см, 1.5 ч)	92.7	99.5
кислотный гидролиз 0.1 М раствором HCl (70 °С; 3 ч)	13.2	99.7
окислительное разложение 3 % раствором H ₂ O ₂ (70 °С; 3 ч)	98.8	99.5

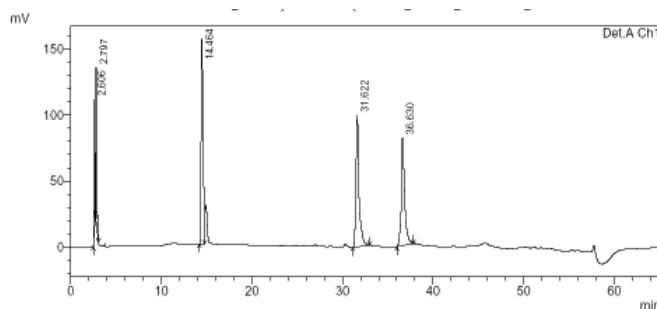


Рис. 9. Разделение кардиотрила (tR=36.6) с продуктами полуреакции 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолием бромидом (tR=14,5) и п-диметиламинобензальдегидом (tR=31.6) в режиме градиентного элюирования.

смеси ацетонитрил–вода (1:1) хроматографируют, получая не менее 5 хроматограмм для каждого раствора в следующих условиях:

- колонка Kromasil C18, размером 250 × 4,6 мм, заполненная сорбентом с размером частиц 5 мкм или аналогичная;
- подвижная фаза ацетонитрил–буферный раствор (45:55), дегазированная любым удобным способом;
- скорость подвижной фазы 1 мл/мин;
- температура колонки 35 °С;
- длина волны детектирования 215 нм.

Время хроматографирования должно быть в 3 раза больше времени удерживания основного пика.

На хроматограмме раствора сравнения порядок выхода пиков следующий: бромид-ион в «мертвом» объеме колонки, 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолий-ион,

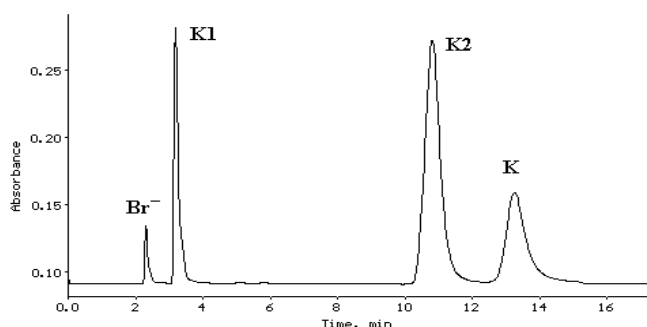


Рис. 10. Разделение кардиотрила (K) с полупродуктами реакции: 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолием бромидом (K1) и п-диметиламинобензальдегидом (K2) в изократическом режиме.

п-диметиламинобензальдегид, кардиотрил.

На хроматограмме испытуемого раствора площади пиков 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолия бромид и п-диметиламинобензальдегида не должны превышать площади пиков 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолия бромид и п-диметиламинобензальдегида, соответственно, на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,5% примеси).

На хроматограмме испытуемого раствора сумма площадей дополнительных пиков, кроме пика 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолия бромид, п-диметиламинобензальдегида и пиков, времена удерживания которых совпадают со временами удерживания пиков на хроматограмме смеси ацетонитрил–вода (1:1), не должна превышать площади пика кардиотрила на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,5% каждой примеси).



ВЫВОДЫ

1. Исследованы физико-химические свойства (по данным УФ-, ИК-, ЯМР-, хромато-масс-спектрологии, ТСХ, ГЖХ, ВЭЖХ, потенциометрии) с целью разработки методик аналитического обеспечения синтеза и создания ГЛС производных 1,2,4-триазола: тиотриазолина, МТ и кардиотрила.

2. Разработаны методики определения примесей в биологически активной субстанции кардиотрил методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, позволяющие отделить и количественно определить как промежуточные продукты синтеза, так и продукты распада при стрессовых условиях хранения (УФ-облучение светом ртутной лампы; кислотный гидролиз 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной; окислительное разложение 3% раствором водорода пероксида), что определило хранение субстанций кардиотрила, МТ и их лекарственных форм в защищенном от света месте; их растворы должны содержать в своем составе антиоксиданты.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Георгиевский Г.В.* Целенаправленный поиск новых фармакологически активных средств в ряду производных триазола / *Георгиевский Г.В.* // Фармаком. – 2007. – №2. – С. 60–66
2. *Мазур И.А.* Тиотриазолин: фармакологические аспекты и клиническое применение / *И.А. Мазур, Н.А. Волошин, И.С. Чекман [и др.]* – Запорожье, 2005. – 146 с.
3. *Мазур И.А.* Метаболические препараты / *Мазур И.А., Чекман И.С., Беленков И.Ф. [и др.]* – Запорожье, 2007. – 309 с.
4. Пат. Україна №79912, МПК, СО7D249/08, А61К31/4196 Спосіб одержання броміду 1-(β-фенілети́л)-4-(димети́ламінобензиліденаміно)-1,2,4-триазолу / *Мазур І.А., Авраменко М.О., Кучеренко Л.І., Георгієвський Г.В., Портна О.О.* Опубл. Бюл. №2 – 4 с.
5. *Чекман И.С.* Некоторые аспекты кардиопротекторного действия потенциального антиангинального препарата МТ при моделировании острой ишемии миокарда / *Чекман И.С., Колесник Ю.М., Мазур И.А., Беленков И.Ф. и др.* // Запорожский медицинский журнал. – 2010. – Т.12, №5. – С.198–201.
6. Пат. №2136669 Российская Федерация Бромид 1-β (фенилэтил)-4-(п-диметиламинобензиліденаміно)-1,2,4-триазолия, обладающий антиоксидантным, противоишемическим, аденоблокующим и утероническим и снижающим внутриглазное давление действием / *Мазур И.А., Авраменко Н.А., Беленчев Н.Ф., Дунаев В.В., Георгиевский Г.В., Загородних О.В., Луценко Н.С., Нестерова Н.А., Стец В.Р., Фаворитов В.Н.*
7. *Георгиевский Г.В.* Контроль качества лекарственных средств на основе тиотриазолина / *Георгиевский Г.В., Гризодуб А.И., Хованская Н.П., Мазур И.А. [и др.]* // Фармаком. – 1995. – №1–2. – С. 28–34.
8. *Георгиевский Г.В.* Обоснование проведения анализа производных 1,2,4-триазола при кислотно-основном титровании в неводных средах / *Георгиевский Г.В.* // Фармаком. – 2008. – №4. – С. 60–65.
9. *Кучеренко Л.І.* Розробка методів стандартизації нового лікарського препарату кардіотрил / *Кучеренко Л.І., Георгієвський Г.В., Шаповалова Л.І.* // Фармаком. – 2008. – №3. – С. 55–60.
10. *Георгиевский Г.В.* Аналитическое обеспечение синтеза и создания готовых лекарственных форм – производных 1,2,4-триазола / *Георгиевский Г.В., Мазур И.А.* // 8 Українська конференція з аналітичної хімії з міжнародною участю. Тези допов. – Одеса, 2008. – С.178.
11. *Георгиевский Г.В.* Определение примесей в отечественных субстанциях – производных 1,2,4-тиотриазолина методом обращенно-фазовой ВЭЖХ / *Георгиевский Г.В., Куликов А.Ю.* // Фармаком. – 2009. – №2. – С. 87–97.
12. International Conference of Harmonization, Q2A: Text on validation of analytical procedures // US FDA Federal Register. – 1995. – Vol. 60.
13. International Conference of Harmonization, Q2B: Validation of analytical procedures: methodology // US FDA Federal Register. – 1997. – Vol. 62.
14. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків: PIPEГ, 2001. – 556 с.
15. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків: PIPEГ, 2001. – Доповнення 1. – 2004. – 520 с.
16. *Adamovics J.A.* Chromatographic analysis of pharmaceuticals / *Adamovics J.A.* – New York: Marcel Dekker, 1997.
17. *Pool C.F.* Contemporary practice of chromatography / *Pool C.F., Schuette S.A.* – New York – Amsterdam – Oxford – Tokyo, 1984. – 708 p.
18. ACD / Labc 10. – Режим доступа: www.acdlabs.com
19. *Шатц В.Д.* Высокоэффективная жидкостная хроматография / *Шатц В.Д., Сахартова О.В.* – Рига: Зинатне, 1988. – 390 с.

Сведения об авторе:

Георгиевский Г.В., к. фарм. н., ст. н. с. ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр».

Адрес для переписки:

Георгиевский Геннадий Викторович. 61022, г. Харьков, пр. Правды, 7, кв. 134.

Рецензент: проф. С.И. Коваленко
Поступила в редакцию 04.11.2010 г.