

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2003

Д. Е. Караванова¹, Б. М. Пятин², Н. В. Климова², Н. И. Авдюнина²,
О. Б. Степаненко², Е. А. Цветкова², Н. В. Шаменкова¹, В. И. Прокофьева¹

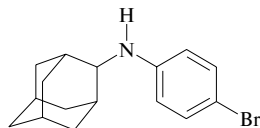
АНАЛИЗ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ НОВОГО ПСИХО- И ИММУНОТРОПНОГО ПРЕПАРАТА ЛАДАСТЕН

¹ ММА им. И. М. Сеченова, Москва;

² НИИ Фармакологии РАМН, Москва

Ладастен (I) — оригинальное психостимулирующее, анксиолитическое и иммунотропное лекарственное средство из группы производных адамантана, который был впервые синтезирован и фармакологически изучен в НИИ Фармакологии РАМН [1, 2].

По химическому строению I представляет собой N-(адамант-2-ил)-N-(*p*-бромфенил)амин.



Получают I по реакции Лейкарта из адамантан-2-она и *p*-броманилина [3].

Цель настоящих исследований состояла в изучении физико-химических свойств, разработке методов анализа, установлении норм качества и срока годности субстанции ладастена.

Экспериментальная часть

Ладастен — кристаллический порошок белого или почти белого цвета, практически нерастворим в воде, мало растворим в этаноле 95 %, умеренно растворим в гексане, легко растворим в хлороформе, диоксане, ацетоне и эфире.

Для идентификации I использованы методы ИК-, УФ-, ПМР-спектроскопии и качественная реакция.

ИК-спектры сняты на спектрофотометре Perkin-Elmer 580 (Швеция) в таблетках калия бромид и характеризуются следующими полосами поглощения (см^{-1}): 3415 (вторичная аминогруппа); 2852–2913 (валентные колебания протонов –СН-адамантанового фрагмента); полосы 1450–1500 принадлежат валентным колебаниям С=C-связей в ароматике; деформационные колебания –NH-группы наблюдаются при 1610 и являются характеристическими; поглощение при 809 соответствует 1,4-замещению в бензоле; интенсивная полоса поглощения при 506 принадлежит колебанию связи С–Br (рис. 1).

Спектр ПМР снят на ЯМР-спектрометре АС-250 (Брукер) с использованием стандартного Брукеровского пакета микропрограмм в ДМСО- d_6 , внутренний стандарт ТМС. Он характеризуется следующими полосами (δ , м.д.): 1,37–2,10 м (14H, Ad); 3,41 м (1H, 2-H Ad); 5,75 д (1H, NH); 6,57 м и 7,15 м (4H, Ar) (рис. 2).

Изучены УФ-спектры I, снятые на спектрофотометре Spereord UV VIS (Германия). Показано, что величина оптической плотности 0,001 % хлороформных растворов I в максимуме поглощения 260 нм плохо воспроизводится от опыта к опыту. При использовании в качестве растворителя этанола 95 % получали хорошо воспроизводимые значения оптической плотности растворов. Так как I мало растворим в этаноле, его сначала растворяли в хлороформе, а затем получен-

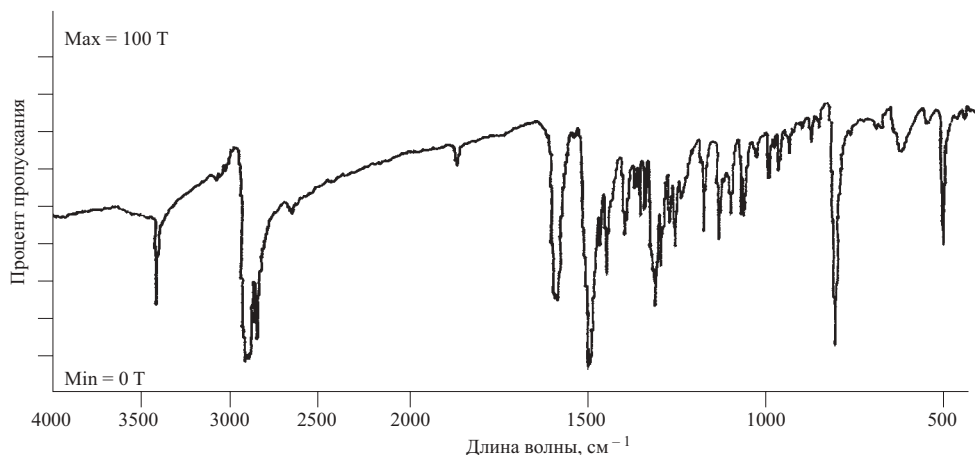


Рис. 1. Инфракрасный спектр ладастена.

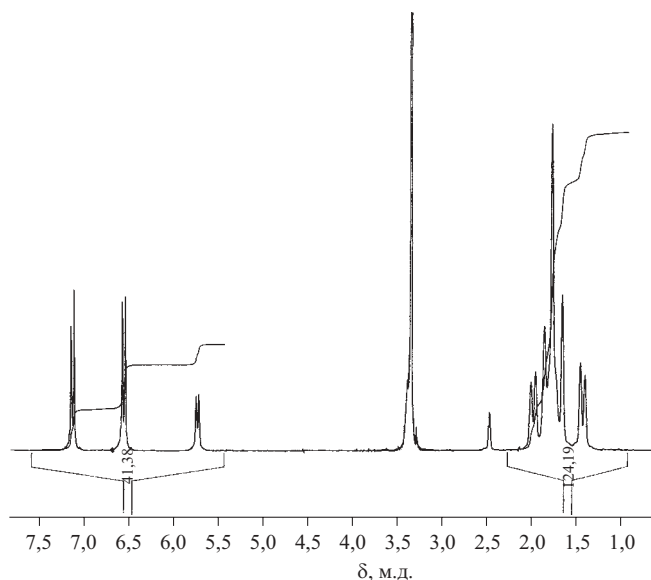


Рис. 2. ПМР-спектр ладастена.

ный раствор разводили спиртом 1:100. УФ-спектр данного раствора имеет максимум поглощения 260 ± 2 нм, обусловленный наличием бензольного кольца в молекуле I, и широкую полосу слабой интенсивности с максимумом около 310 нм (рис. 3)*.

Для подтверждения подлинности субстанции I предложена качественная реакция его окисления до производного *o*- или *m*-хинонимина под действием смеси концентрированных серной и азотной кислот с образованием синего окрашивания. Эта реакция является специфической на ладастен. В аналогичных условиях адамантан-2-он и *n*-броманилин (исходные вещества для синтеза I) дают соответственно желтое и красное окрашивание. Методика реакции: к 0,05 г препарата прибавляют 1 мл концентрированной серной кислоты и 3 капли концентрированной азотной кислоты. При перемешивании в течение 2 мин раствор приобретает синее окрашивание.

Все образцы I, предварительно высушенные при 80°C до постоянной массы, плавятся без разложения в интервале температур от 103 до 108°C . 2 % растворы I в ацетоне во всех случаях были прозрачные и бесцветные или не превышали эталон мутности I и эталон цветности 76.

Для оценки чистоты субстанции I использовали метод ТСХ на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) или аналогичных последним. В качестве возможных примесей в I могут присутствовать исходные вещества синтеза — *n*-броманилин (II) и адамантан-2-он (III), а также промежуточно образующийся *n*-бромформанилид (IV). При подборе состава подвижной фазы учитывали селективность и элюирующую силу входящих в нее компонентов [4]. Наилучшее разделение указанных соединений наблюдалось в системе растворителей гексан – ацетон (6:1).

I, II и IV обнаруживали, просматривая пластинку в УФ-свете при длине волны 254 нм. Для детектирова-

* Выражаем благодарность Лезиной В. П., Винокурову В. Г., Троицкой В. С. за снятие спектров.

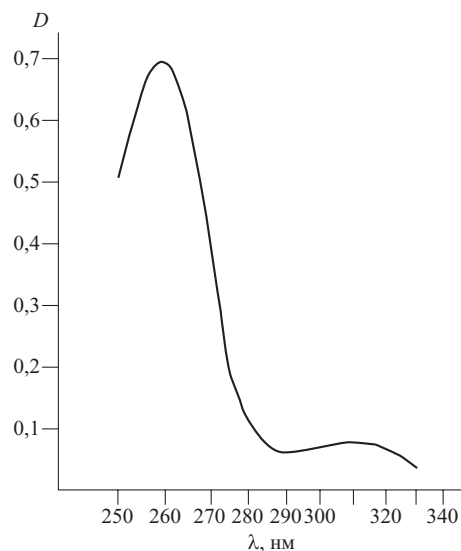


Рис. 3. Ультрафиолетовый спектр ладастена.

ния III, который не содержит хромофорных групп, пластинку опрыскивали раствором 2,4-динитрофенилгидразина в спирте (1:1). В этом случае III проявляется в виде желтого пятна. II обнаруживали также, обрабатывая пластинку парами окислов азота, а затем опрыскивая 0,5 % раствором β-нафтола в 95 % спирте с последующим нагреванием (реакция на ароматическую аминогруппу). На хроматограмме II проявляется в виде розового пятна. Наблюдались следующие значения R_f разделяемых веществ: I — $0,47 \pm 0,05$; II — $0,13 \pm 0,02$; III — $0,37 \pm 0,03$; IV — $0,06 \pm 0,02$.

Были определены пределы обнаружения разделяемых соединений на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) в системе гексан – ацетон (6:1) указанными способами детектирования (табл. 1). Как видно из таблицы, чувствительность обнаружения II в УФ-свете значительно ниже, чем по реакции образования азокрасителя. Поэтому для обнаружения примеси II в I пластинку обрабатывали парами окислов азота и спиртовым раствором β-нафтола.

Для полуколичественной оценки содержания примесей наносили на пластинку I в количестве 200 мкг и шкалу рабочего стандартного образца (PCO) I в количествах 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 мкг. При анализе образцов I, как свежеприготовленных, так и хранившихся в течение 3 лет и более, в 200 мкг препарата не были обнаружены примеси II, III и IV. В то же время, при просматривании хроматограмм в УФ-свете обнаруживалось до

Таблица 1
Пределы обнаружения ладастена и возможных примесей, мкг

Разделяемое соединение	Способ детектирования		
	УФ (254 нм)	Окислы азота + β-нафтол	2,4-динитрофенилгидразин
Ладастен	0,05	0,06	—
<i>n</i> -Броманилин	0,2	0,01	—
<i>n</i> -Бромформанилид	0,01	10	—
Адамантан-2-он	—	—	0,1

Результаты анализа образцов ладастена

№	Внешний вид	Растворимость						Прозрач- ность 2 % раствора в ацетоне	Цветность 2 % рас- твора в ацетоне	Т. пл., °С	Посторонние примеси, %	Потеря в массе при высу- шивании, %	Количес- твенное содержа- ние, %
		Вода	Этанол 95 %	Хлоро- форм	Ацетон	1,4-диок- сан	Гексан						
1	почти белый мелкокристалли- ческий порошок	1:> 10000	1:500	1:2	1:8	1:6	1:70	<эталона I	<эталона 7б	104,4 – 106,9	–	0,2	100,1
2	почти белый мелкокристалли- ческий порошок	1:> 10000	1:700	1:2	1:4	1:3	1:50	<эталона I	<эталона 7б	104,1 – 106,7	0,05 (R_f 0,60), 0,1 (R_f 0,19), сумма 0,15	0,2	99,67
3	белый мелкокри- сталлический порошок	1:> 10000	1:700	1:2	1:6	1:4	1:75	прозрач- ный	<эталона 7б	106,2 – 107,7	–	–	98,72
4	белый мелкокри- сталлический порошок	1:> 10000	1:750	1:3	1:4	1:3	1:60	<эталона I	<эталона 7б	103,3 – 106,7	0,05 (R_f 0,57)	0,2	99,04
5	белый мелкокри- сталлический порошок	1:> 10000	1:700	1:3	1:5	1:3	1:70	прозрач- ный	<эталона 7б	104,7 – 107,0	0,1 (R_f 0,60)	0,2	99,53

двух неидентифицированных примесей с R_f около 0,19 и около 0,59. Содержание индивидуальной примеси во всех испытуемых образцах I не превышало 0,2 %, а сумма примесей не превышала 0,5 %.

Субстанция I не гигроскопична, потеря в массе при высушивании, определенная при 80 °С, для всех образцов не превышала 0,5 %. Содержание остаточного растворителя, изопропанола, определяли методом ГЖХ [5] на хроматографе Chrom-5 (Чехия) с пламенно-ионизационным детектором. Разделение проводили на стеклянной колонке 2,4 м × 0,3 см с сорбентом Sерагон СНН 0,063 – 0,125 мкм. Температура термостата колонки 175 °С, температура испарителя и детектора 190 °С. Скорость потока газа-носителя (азота) — 30 мл/мин, водорода — 30 мл/мин, воздуха — 300 мл/мин. Содержание изопропанола определяли методом внутреннего стандарта, в качестве которого использовали этиловый эфир уксусной кислоты (х.ч. для хроматографии). Время удерживания изопропанола — 4,4 мин, этилацетата — 8,7 мин. Степень газохроматографического разделения изопропанола и этилацетата $R_s = 5,2$. Относительные времена удерживания изопропанола — 0,51, этилацетата — 1. Результаты анализа показали, что содержание изопропанола в различных образцах препарата составило не более 0,1 %.

Количественное содержание I определяли методом неводного титрования. По химической структуре I представляет собой вторичный амин. При неводном титровании вторичных аминов в ледяной уксусной кислоте возможно ацетилирование. Для ладастена большое значение имеет время его взаимодействия с ледяной уксусной кислотой. Так, оставленный на сутки в ледяной уксусной кислоте I ацетилируется на 40 %. Поэтому нами были подобраны условия, при которых побочная реакция ацетилирования либо совсем не происходит, либо сильно замедляется. С этой целью обычно используют апротонные растворители (1,4-диоксан, гексан, четыреххлористый углерод) [6]. Мы ис-

пользовали 1,4-диоксан, в котором растворяли навеску I и непосредственно перед титрованием прибавляли ледяную уксусную кислоту. В качестве титранта использовали 0,1 М раствор хлорной кислоты. Конечную точку титрования определяли потенциометрически либо по изменению окраски индикатора кристаллического фиолетового. Скачок потенциала соответствовал переходу окраски индикатора от голубого до голубовато-зеленого цвета. Потенциометрическое титрование осуществляли при помощи иономера ЭВ-74 с использованием стеклянного и хлорсеребряного электродов.

Содержание I во всех образцах находилось в интервале от 98,5 до 101,0 %. Результаты анализа некоторых образцов I приведены в табл. 2.

Изучение стабильности I проводили в естественных условиях [7]. Образцы субстанций анализировали по всем приведенным выше показателям. Препарат выдерживает хранение в естественных условиях более 5 лет. В настоящее время установлен предварительный срок годности ладастена — 3 года.

Разработанные методы анализа и нормы качества положены в основу ФСП на субстанцию ладастена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. В. Климова, Н. М. Зайцева, Б. М. Пятин и др., Патент РФ № 1601978, *Бюл. изобрет.*, № 30 (1995).
2. И. С. Морозов, Н. Г. Арцимович, Т. А. Фадеева и др., Патент СССР № 182906, *Бюл. изобрет.*, № 25 (1992).
3. И. С. Морозов, Н. В. Климова, Л. Н. Лаврова и др., *Хим.-фарм. журн.*, 32(1), 3 – 6 (1998).
4. К. И. Сакодынский, В. В. Бражников, С. А. Волков и др., *Аналитическая хроматография*, Наука, Москва (1993).
5. European pharmacopoeia III ed. (1997), Supplement 2000, pp. 295 – 302.
6. И. Денеш, *Титрование в неводных средах*, Мир, Москва (1971).
7. ОСТ 91500.05.001–00. Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения.

Поступила 07.04.03