

Е. В. Бартенева, О. Б. Степаненко, Н. И. Авдюнина, Р. Ф. Большакова,  
Н. В. Климова, М. И. Устинова, Б. М. Пятин

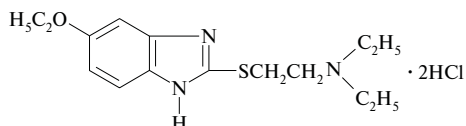
## АНАЛИЗ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ НОВОГО ОТЕЧЕСТВЕННОГО БРАДИКАРДИЧЕСКОГО СРЕДСТВА БРАДИЗОЛ

НИИ Фармакологии РАМН, Москва

Среди производных 2-меркаптобензимидазола известны препараты, обладающие адаптогенным, кардиотропным, гастропротективным, анксиолитическим действием [1 – 4].

В НИИ фармакологии РАМН впервые синтезирован и фармакологически изучен новый оригинальный препарат Бразидол — производное 2-меркаптобензимидазола, обладающий противоишемическим и антиаритмическим действием [5]. В настоящее время разрешены клинические испытания бразидола в качестве специфического брадикардического средства.

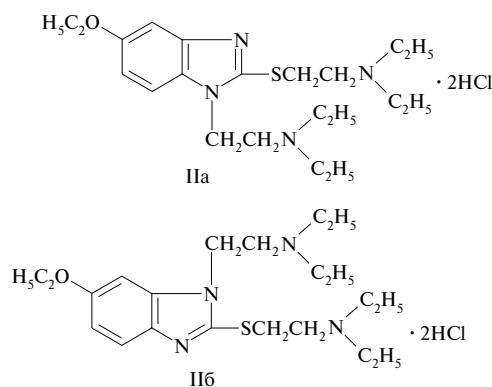
По химическому строению бразидол представляет собой 2-[2-(диэтиламино)этилтио]-5-этоксibenзимидазола дигидрохлорид:



Основание бразидола получают взаимодействием 5-этокси-2-меркаптобензимидазола (I) с гидрохлоридом (2-диэтиламино)этилхлорида. Реакцию проводят в водно-щелочной среде при 20 – 25 °С. Выделившийся в виде масла продукт реакции экстрагируют хлороформом, очищают, затем упаривают растворитель. Полученное основание растворяют в сухом ацетоне и выделяют бразидол добавлением раствора хлористого водорода в спирте до pH 1 – 2. Технический бразидол отфильтровывают, высушивают до постоянного веса и кристаллизуют из абсолютного этанола с добавлением активированного угля. Фармакопейный продукт высушивают до постоянного веса при 85 – 95 °С.

Известно, что амбидентный анион бензимидазолин-2-тиона алкилируется исключительно по атому серы [6]. Однако при изучении реакционных масс и технических образцов бразидола методом ТСХ на пластинках Кизельгель 60 F<sub>254</sub> в системе растворителей ацетон – гексан – аммиак конц. 20:20:0,5 (проявление в УФ-свете) нами, помимо основного пятна бразидола, обнаружено дополнительное пятно побочного соединения с более высоким значением R<sub>F</sub>. Концентрацией маточных растворов от кристаллизации бразидола и последующей дробной кристаллизацией побочное соединение было выделено в индивидуальном виде. Это вещество представляло собой белые с кремоватым оттенком кристаллы, плавящиеся при 192 – 194 °С. Его смешанная проба с бразидолом давала депрессию температуры плавления в 30 °С. По данным элементного анализа и ПМР-спектроскопии выделенное вещество было идентифицировано как продукт бис-алкилирования 5-этоксibenзимидазолин-2-тиона по атому серы и

атому азота и представляло собой смесь двух изомеров (II а, б):



В спектре ПМР IIа, б (в D<sub>2</sub>O) наблюдаются сигналы, принадлежащие N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N-группе (δ, м.д.): 3,73 (т, 2H, CH<sub>2</sub>) и 4,75 (т, 2H, CH<sub>2</sub>), а также двойной набор сигналов ароматических протонов (δ, м.д.): II а 7,17 (дд, 1H, 6-H); 7,34 (д, 1H, 4-H) и 7,58 (д, 1H, 7-H); II б 7,13 (дд, 1H, 5-H); 7,34 (д, 1H, 7-H) и 7,76 (д, 1H, 4-H).

По интегральной интенсивности сигналов соотношение изомеров (IIа:IIб) оценено как 80:20.

Полученные данные, вероятно, свидетельствуют о том, что в условиях реакции алкилирования основание бразидола, как и омепразол [3], существует в виде смеси двух таутомеров.

Целью настоящих исследований явилось изучение физико-химических свойств, разработка методов анализа, установление срока годности и научно-обоснованных норм качества субстанции бразидола.

### Экспериментальная часть

Бразидол — белый или белый с кремоватым оттенком кристаллический порошок, легко растворимый в воде, умеренно растворим в спирте 95 %, мало растворим в хлороформе.

Для стандартизации субстанции по показателям прозрачность, цветность, pH были приготовлены 1, 2, 5 и 10 % водные растворы. По цветности 1 % водные растворы были бесцветными или не превышали эталона 7б, более концентрированные растворы не выдерживали сравнения с эталонами 6б и 5б. По прозрачности водные растворы всех концентраций не превышали эталона мутности I. Значение pH 1 % водных растворов находилось в интервале 2,0 – 3,0.

ИК-спектры сняты на спектрофотометре Perkin-Elmer 580 (Швеция) в таблетках калия бромида и в вазелиновом масле, спектры ПМР — на ЯМР-спектромет-

ре AC-250 (Брукер) с использованием стандартного Брукеровского пакета микропрограмм.

Строение бразилола подтверждено аналитическими и спектральными данными. Были сняты ИК-спектры всех образцов субстанции в таблетках калия бромида и в вазелиновом масле в области от 4000 до 400  $\text{см}^{-1}$ . В указанных областях как в вазелиновом масле, так и в таблетках калия бромида спектры образцов отличаются по количеству полос и их интенсивности в зависимости от содержания влаги в препарате. Так как в таблетках калия бромида полосы поглощения бразилола выражены более четко, то идентификацию препарата предлагаем проводить в таблетках калия бромида. В ИК-спектре бразилола наблюдаются при 3400–3300  $\text{см}^{-1}$  полосы поглощения, характеризующие ОН-группы воды, содержание которой нормируется не более 9 %. Для органической части молекулы характерны полосы валентных колебаний  $\text{C}=\text{N}$  в области 1635  $\text{см}^{-1}$ ;  $\text{C}=\text{C}$  в области 1510 и 1320  $\text{см}^{-1}$ , деформационных колебаний  $\text{C}-\text{H}$  в области 1460  $\text{см}^{-1}$ , а также  $\text{C}-\text{N}$  — в области 1268  $\text{см}^{-1}$  и  $\text{Ar}-\text{O}-\text{Alk}$  — в области 1120 и 1050  $\text{см}^{-1}$ .

ПМР-спектр бразилола ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ , м.д.: 1,42 (т, 6H,  $\text{CH}_3$   $\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>N); 1,53 (т, 3H,  $\text{CH}_3$   $\text{CH}_2$  O); 3,44 (кв, 4H ( $\text{CH}_3\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>N); 3,68 (т, 2H,  $\text{CH}_2\text{S}$ ); 3,82 (т, 2H,  $\text{CH}_2$  N); 4,19 (кв, 2H,  $\text{CH}_3$   $\text{CH}_2$  O); 7,19 (уш.с, 1H, 4-H); 7,21 (неразр. д, 1H, 6-H); 7,59 (д, 1H, 7-H).

УФ-спектр 0,0015 % раствора препарата в 0,01 М растворе кислоты хлористоводородной в области от 210 до 350 нм имеет максимум поглощения при (302 ± 2) нм.

Определение содержания посторонних примесей в субстанции бразилола проводили по следующей методике: 0,02 г препарата растворяют в 2 мл смеси хлороформ – диэтиламин, 9:1. Наносят 0,01 мл (100 мкг) полученного раствора на линию старта предварительно обработанной пластинки Кизельгель 60 F<sub>254</sub> (Мерк) размером 15 × 15 см. Рядом наносят по 0,01 мл растворов Б (0,1 мкг), В (0,3 мкг), Г (0,5 мкг), А (1 мкг) рабочего стандартного образца (PCO) бразилола.

На ту же пластинку наносят 0,01 мл раствора смеси бразилола и афобазола по 100 мкг для проверки пригодности хроматографической системы.

Пластинку с нанесенными пробами сушат в течение 5 мин и помещают в камеру со смесью растворителей: ацетон – гексан – аммиака конц. раствор, 20:20:0,5 и хроматографируют восходящим методом. Когда фронт растворителей пройдет расстояние 10 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 10 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

Пятна примесей, полученных на хроматограмме испытуемого образца, сравнивают по совокупности величины и интенсивности окраски со шкалой свидетелей (растворы PCO бразилола).

Образцы субстанции плавятся без разложения при температуре от 175 до 181 °С.

## Результаты и их обсуждение

Для оценки чистоты субстанции использовали метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках Кизельгель 60 F<sub>254</sub> (Мерк). Возможными примесями в препарате могут быть промежуточные и побочные продукты синтеза: 5-токси-2-меркаптобензимидазол (I) ( $R_f$  0,36 ± 0,03), и N-диэтиламиноэтил-2-диэтиламиноэтилтио-5-этоксibenzимидазола дигидрохлорид (II а, б) ( $R_f$  0,64 ± 0,03), а также продукты окисления бразилола. В качестве системы для нанесения проб на хроматограмму была выбрана смесь хлороформ – диэтиламин, 9:1. Обнаружение зон адсорбции проводили в УФ-свете при 254 нм.  $R_f$  пятна бразилола на хроматограмме испытуемого раствора находится в пределах 0,52 – 0,62.

При подборе состава подвижной фазы учитывали селективность и элюирующую силу входящих в нее компонентов [7]. Нами изучен ряд систем и установлено, что наилучшее разделение достигается в системах основного характера. Для этой цели в состав подвижной фазы вводили концентрированный раствор аммиака. Наилучшие результаты разделения бразилола, исходных соединений и неидентифицированных примесей были получены в системе ацетон – гексан – аммиака конц. раствор, 20:20:0,5.

Исследования показали, что соединения I и II а, б в образцах бразилола не обнаружены. Были обнаружены две неидентифицированные примеси, которые, вероятно, представляют собой продукты окисления бразилола, т.к. интенсивность их увеличивается после воздействия на субстанцию прямого солнечного света. Этих примесей в качестве свидетелей мы не имели, поэтому для полуколичественной оценки их содержания величину и интенсивность пятен примесей сравнивали со шкалой свидетелей бразилола от 0,1 до 1 мкг в пятне, что составляет от 0,1 до 1 %.

Исследования показали, что во всех образцах субстанции обнаружены едва уловимые следы неидентифицированной примеси с  $R_f$  0,47 ± 0,03, а в некоторых образцах были найдены следы неидентифицированной примеси с  $R_f$  0,31 ± 0,03. Содержание первой составляло 0,3 – 0,5 %, а второй — 0,3 %.

На основании полученных результатов предложено нормировать содержание индивидуальной примеси не более 0,5 %, суммарное содержание примесей не более 1 %.

Потеря в массе свежеприготовленных образцов бразилола, определенная при 105 °С, составляла от 0,39 до 1,21 %, но уже через месяц хранения в естественных условиях в стеклянных банках с пластмассовыми навинчиваемыми крышками показатель потери в массе вырос до 5,55 – 9,08 %, а через год он составлял 7,34 – 8,84 %. Дальнейшее хранение в естественных условиях показало, что величина потери в массе стабильно удерживается в интервале 7,5 – 8,5 %.

Было проведено изучение гигроскопичности препарата в соответствии с требованиями инструкции по проведению работ по изучению устойчивости лекар-

**Результаты количественного определения бразидзола методом неводного титрования**

Номер серии	Содержание основного вещества, %	Метрологические характеристики, $n = 5, P = 95 \%$
1.	99,52 100,79 99,24 99,92 100,01	$X = 99,90 S = 0,59 S_x = 0,26$
2.	99,51 98,92 98,69 99,32 98,79	$X = 99,05 S = 0,36 S_x = 0,16$
3.	100,28 98,99 99,53 100,31 99,78	$X = 99,80 S = 0,56 S_x = 0,25$
4.	98,62 99,51 100,38 99,83 99,36	$X = 99,54 S = 1,13 S_x = 0,51$
5.	99,75 98,97 98,85 100,49 99,93	$X = 99,60 S = 1,38 S_x = 0,61$

ственных средств — субстанций к воздействию влаги и других химически активных компонентов воздуха [8].

Результаты исследований показали, что образцы препарата, высушенные до постоянной массы и помещенные в камеру с 90 % влажностью, за одни сутки поглощают до 11 % влаги, после чего масса вещества и внешний вид препарата не изменяются. Это говорит о том, что препарат обладает способностью к образованию кристаллогидрата с двумя молекулами воды (теоретическое содержание влаги в дигидрате составляет 8,9 %). Следует отметить значительное снижение температуры плавления неотсушенных образцов препарата. Наблюдаемые колебания содержания влаги в процессе хранения свидетельствуют о непрочности кристаллогидрата. На основании наблюдаемых данных и неустойчивости показателя “Потеря в массе при высушивании” устанавливаем норму содержания влаги не более 9 %.

На стадии кристаллизации бразидзола используют абсолютный этанол, который может остаться в продукте в качестве органической примеси. Для ее определения использовали метод ГЖХ. Содержание остаточного этанола определяли методом газожидкостной хроматографии на хроматографе Хром-5 с пламенно-ионизационным детектором. Колонка стеклянная 2,4 м × 3,0 мм, неподвижная фаза Separon CHN 0,063 – 0,122 мкм, температура колонки 170 °С, газ

носитель азот. Внутренний стандарт *n*-бутанол. Результаты анализа показали, что содержание этанола составляет не более 0,18 % (1800 ppm), что является допустимым для спирта (норма не более 0,5 % (5000 ppm)).

Количественное содержание основного вещества в бразидзоле определяли методом неводного кислотно-основного титрования в среде муравьиной кислоты и уксусного ангидрида. Конечную точку титрования определяли потенциометрически и по переходу окраски индикатора кристаллического фиолетового от фиолетовой до желтой.

Количественное определение бразидзола проводили по следующей методике: около 0,15 г (точная навеска) препарата растворяют в 2 мл муравьиной кислоты, прибавляют 25 мл уксусного ангидрида, титруют 0,1 М раствором хлорной кислоты. Конечную точку титрования определяют, добавляя 0,1 мл раствора кристаллического фиолетового, и титруют до желтой окраски индикатора. 1 мл 0,1 М раствора кислоты хлорной соответствует 0,01832 г  $C_{15}H_{23}N_3OS \cdot 2HCl$ .

Содержание основного вещества находилось в интервале от 98,5 до 100,5 % в пересчете на сухое вещество.

Стабильность бразидзола изучали методом “Ускоренного старения” при температуре 60 °С [9]. Исследуемые образцы по истечении срока, эквивалентного 2 годам хранения в естественных условиях, выдерживали испытания по всем показателям качества. На основании проведенных исследований установлен предварительный срок годности бразидзола 2 года.

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

## ЛИТЕРАТУРА

1. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Т. 1, Медицина, Москва (1993), с. 517.
2. С. У. Росс, W. G. Friebe, W. Kampe, et al., Заявка ФРГ 2801980; *РЖ Химия*, Химия 10 О 123П (1980).
3. А. Brandstrom, P. Lindberg, U. Junggren, Y. Scand, *Gastroenterol.*, **20**, 15 – 20 (1985).
4. С. Б. Середенин, Ю. А. Бледнов, В. Л. Савельев и др., Патент РФ 2061686; *Бюл. Изобрет.*, № 16 (1996).
5. С. Б. Середенин, В. Л. Савельев, Т. Я. Можаяева и др., Патент РФ 2136667; *Бюл. Изобрет.*, № 25 (1999).
6. А. Ф. Пожарский, В. А. Анисимова, Е. Б. Цупак, *Практические работы по химии гетероциклов*, Изд-во Ростовского Университета, Ростов (1988), с. 138.
7. К. И. Саколынский, В. В. Бражников, С. А. Волков и др., *Аналитическая хроматография*, Наука, Москва (1993).
8. *Инструкция по проведению работ по изучению устойчивости лекарственных средств-субстанций к воздействию влаги и других химически активных компонентов воздуха*, Минздрав СССР, Москва (1977).
9. *Временная инструкция по проведению работ с целью определения сроков годности лекарственных средств на основе метода “ускоренного старения” при повышенной температуре И42-8-82*, Минздрав СССР, Москва (1982).

Поступила 30.06.03