

Е. А. Краснов<sup>1</sup>, Е. Е. Назмутдинова<sup>1</sup>, И. С. Иванов<sup>2</sup>, И. Ю. Чукичева<sup>3</sup>,  
А. В. Кучин<sup>3</sup>, М. Б. Плотников<sup>2</sup>

## РАЗРАБОТКА МЕТОДИК АНАЛИЗА НОВОГО ПРОСТРАНСТВЕННО-ЗАТРУДНЕННОГО ФЕНОЛА ДИБОРНОЛА В КАЧЕСТВЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия;

<sup>2</sup> НИИ фармакологии СО РАМН, Томск, Россия;

<sup>3</sup> Институт химии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

Разработаны методики контроля качества новой фармацевтической субстанции 4-метил-2,6-диизоборнилфенола (диборнола).

**Ключевые слова:** субстанция диборнола, методы анализа.

В последнее время возрос интерес к производным пространственно-затрудненных фенолов (ПЗФ) в связи с открытием многочисленных аспектов их практического использования [1, 2]. Одним из перспективных соединений данной группы является диборнол (4-метил-2,6-диизоборнилфенол), проявляющий выраженную антирадикальную, гемореологическую, анти-тромбоцитарную и антитромбогенную активность в сочетании с его низкой токсичностью [3, 4]. Таким образом, диборнол — новое эффективное и низкотоксичное соединение, обладающее выраженным влиянием на сосудисто-тромбоцитарный гемостаз [5] и является основой для создания лекарственного средства (ЛС).

Задачей настоящ

ей работы явилась разработка стандартов качества субстанции диборнола. Исследования проводили на 6 опытных сериях субстанции диборнола, синтезированных в Институте химии Коми НЦ УрО РАН.

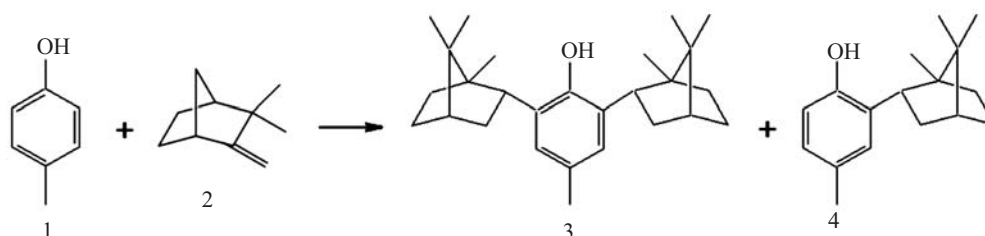
Синтез диборнола осуществлен путем алкилирования *para*-крезола (1) с камфеном (2) в присутствии катализатора *para*-крезолята алюминия при температуре 180 °С в течение 6 ч. Контроль за ходом реакции проходит методом ГЖХ. Для разложения катализатора используется хлористоводородная кислота. Непрореагировавшие крезол и камфен отгоняли при пониженном давлении. После перекристаллизации из этанола был выделен целевой продукт 4-метил-2,6-диизоборнилфенол (3). В качестве побочного продукта реакции возможно образование моноалкилированного *para*-крезола (4) [6].

По внешнему виду диборнол представляет собой бесцветные кристаллы или белый микрокристаллический порошок со специфическим запахом, обладаю-

щий липофильными свойствами: практически нерастворим в воде, очень мало растворим в спирте этиловом 95 %, умеренно растворим в диэтиловом эфире, гексане, ацетоне и легко растворим в хлороформе.

Одним из основных методов, используемых в отечественной и зарубежных фармакопеях [7–10] для идентификации субстанций, является ИК-спектроскопия. Поэтому нами были сняты ИК-спектры диборнола в области от 4000 до 400 см<sup>-1</sup> в дисках с калия бромидом (2 мг/400 мг KBr). ИК-спектры записывали на приборе NICOLET 5700 (США). Для всех исследованных серий субстанции они совпали по положению и относительной интенсивности основных полос поглощения, что позволило получить усредненный спектр диборнола для оценки его подлинности (рис. 1). В ИК-спектре обнаружены следующие полосы поглощения,  $\nu_{\max}$ , см<sup>-1</sup>: 3580, 3529, 3449 (ОН); 3000–2870 (CH<sub>3</sub>-, CH<sub>2</sub>-), 1605, 1459 (ароматическое кольцо). Высокая интенсивность низкочастотной полосы и низкая интенсивность полосы поглощения бензольного кольца при 1459 см<sup>-1</sup> и отсутствие поглощения при  $\nu = 1500 - 1520$  см<sup>-1</sup> характерно для экранированных фенолов с *ortho*-заместителями [11].

Следует отметить, что при использовании ряда липофильных растворителей в зависимости от их характера меняются частоты и интенсивность полос поглощения фенольного гидроксила анализируемого вещества в ИК-области. Так в хлороформе и тетрахлорметане полоса поглощения фенольного гидроксила при 3600 см<sup>-1</sup> наблюдается в виде острых пиков, а в бензоле происходит ее расширение и некоторое смещение,



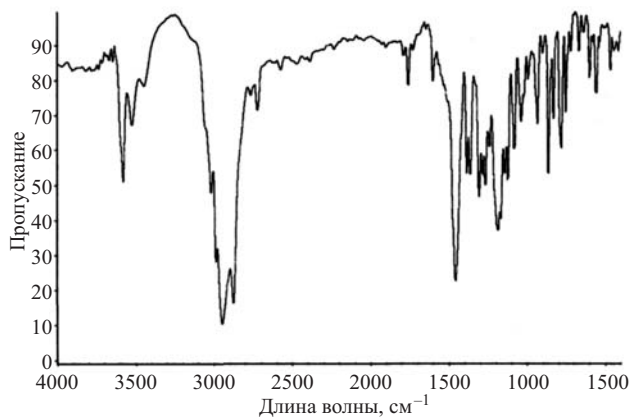


Рис. 1. ИК-спектр диборнола в таблетке с калия бромидом

что указывает на межмолекулярную связь гидроксильных протонов с  $\pi$ -электронной системой бензола.

В УФ-спектре 0,01 % этанольного раствора диборнола, снятого на спектрофотометре СФ-2000 (Россия), обнаруживается 1 максимум поглощения при длине волны  $282 \pm 2$  нм, характерный для *пара*-замещенного фенольного соединения (рис. 2). При этом удельный показатель поглощения диборнола составил  $72,2 \pm 0,9$ .

Учитывая пространственную затрудненность фенольного гидроксила в диборноле, не представляется возможным его обнаружение классическими химическими реакциями — образование азокрасителя и с раствором железа(III) хлорида.

Температура плавления является важным показателем в оценке качества субстанции. Определение проводили в термосистеме FP 83 НТ Mettler Toledo (Швейцария). Температура плавления 6 серий диборнола находилась в пределах от 205 до 209 °С.

Исходя из методики синтеза диборнола, в качестве посторонних примесей могут быть как исходные вещества (*n*-крезол, камфен), так и промежуточный продукт синтеза — 4-метил-2-изоборнилфенол. Однако камфен, вследствие его летучести и низкой температуры плавления удаляется в условиях выделения целевого продукта на стадии вакуумной перегонки и не обнаруживается в опытных сериях диборнола. Для контроля содержания других указанных примесей использовалась тонкослойная хроматография (ТСХ).

Для этого 0,1 г субстанции диборнола растворяли в 10 мл хлороформа (раствор А). К 0,01 мл раствора А прибавляли до 1 мл хлороформа (раствор Б). 0,004 мл раствора А (40 мкг) и 0,002 мл раствора Б (0,2 мкг) наносили на пластинку Sorbfil размером  $3 \cdot 10$  см, высушивали на воздухе в течение 3 мин и помещали в хроматографическую камеру в системе растворителей гексан — этилацетат (95:5), которая является оптимальной подвижной фазой. После прохождения фронтом растворителя около 8 см пластинку вынимали из камеры, высушивали на воздухе в течение 5 мин и затем помещали в йодную камеру. На хроматограмме проявлялись бурые пятна диборнола с  $R_f = 0,80 \pm 0,02$ . В случае наличия примеси *n*-крезола или моноалкилированного производного наблюдаются дополнитель-

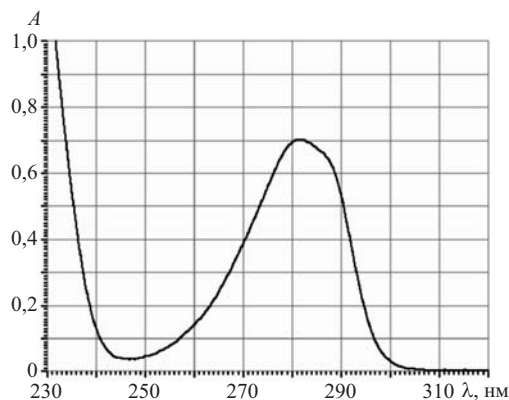


Рис. 2. УФ-спектр 0,01 % этанольного раствора диборнола

ные пятна с  $R_f = 0,90 \pm 0,02$  и  $0,26 \pm 0,02$  соответственно, каждое из которых по величине и интенсивности окраски не должно превышать пятно диборнола раствора Б (0,5 %). Предел обнаружения диборнола составляет 0,2 мкг, *n*-крезола и моноалкилированного производного — 0,0125 и 0,025 мкг соответственно. Для определения  $R_f$  и предела обнаружения пятен использовали РСО 4-метил-2,6-диизоборнилфенола, 4-метил-2-изоборнилфенола и *n*-крезол фирмы Fluka (Германия).

Нормирование неорганических примесей проводили в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи XI и XII изд. [10, 12], используя водный фильтрат субстанции диборнола. Фильтрат выдерживал испытание на хлориды — содержание примеси хлоридов во всех образцах не превышало 0,01 %. Содержание тяжелых металлов определяли из сульфатной зола, которое составило не более 0,001 %.

Для получения фильтрата в колбу вместимостью 100 мл помещали 0,5 г порошка диборнола, прибавляли 25 мл воды и непрерывно встряхивали в течение 5 мин, затем взвесью фильтровали через беззольный фильтр “синяя лента”. Полученный фильтрат (10 мл) использовали для проведения испытаний на хлориды [12].

В испытаниях на прозрачность и цветность раствора было предложено использовать 10 % хлороформный раствор субстанции диборнола, т.к. субстанция лучше всего растворима в хлороформе, широко используемом в ГФ XI.

Для определения прозрачности раствора 1,0 г порошка образцов диборнола растворяли в 10 мл хлороформа при комнатной температуре. Полученные растворы были прозрачны, т.е. выдерживали испытания с растворителем (хлороформ).

Определение цветности раствора весьма важно для оценки качества белых, почти белых или белых с оттенком субстанций. С этой целью 10 % растворы диборнола в хлороформе сравнивали с 10 мл хлороформа, при этом анализируемые растворы были бесцветными [12]. Кроме того, для более корректного определения параметра цветности предложен его контроль с помощью спектрофотометрического метода в видимой области. Установлено, что значение оптиче-

ской плотности 5 % хлороформных растворов субстанции диборнола при длине волны 340 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм не должно превышать 0,1.

Определение содержания влаги проводили методом высушивания при температуре 100 – 105 °С. При этом содержание влаги в образцах 6 серий составило от 0,03 до 0,1 %. Учитывая возможность колебания содержания влаги в других сериях в более широких пределах, предложено нормировать этот параметр на уровне, не превышающем 0,2 %.

Сульфатную золу определяли согласно методике Государственной фармакопеи XI изд. [13]. Содержание сульфатной золы для образцов 6 серий составило от 0,03 до 0,08 %. Исходя из полученных данных, параметр “Содержание сульфатной золы” в проекте ФСП предложено нормировать на уровне не более 0,1 %.

Учитывая отсутствие моноалкилированного производного в субстанции, которое имеет такой же максимум поглощения, что и диборнол, количественное определение диборнола в порошке оценивали спектрофотометрически в УФ-области. Около 0,05 г (точная навеска) порошка диборнола помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и растворяли при встряхивании в 60 мл 95 % этилового спирта. Затем содержимое колбы доводили до метки тем же растворителем (раствор А). 10 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили 95 % этиловым спиртом до метки (раствор Б). Измеряли оптическую плотность раствора Б при длине волны 282 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали спирт этиловый 95 %.

Содержание диборнола в порошке в процентах ( $X$ ) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 50 \cdot 100}{E_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 10 \cdot 100},$$

где  $A$  — оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 282 нм;  $E_{1\text{см}}^{1\%}$  — удельный показатель

поглощения диборнола, равный 72,2;  $a$  — навеска диборнола в граммах.

На основании полученных данных содержание диборнола в порошке предложено нормировать на уровне не менее 98,5 % (таблица).

Испытание на микробиологическую чистоту проводили в соответствии с требованиями ГФ XII [10], диборнол в условиях испытания не обладал антимикробным действием. Сформулированным требованием микробиологической чистоты порошка диборнола на основе микробиологических исследований является следующее: в 1 г препарата допускается не более 1000 аэробных бактерий и 100 грибов (дрожжевых и плесневых) при отсутствии бактерий *Escherichia coli*, т.е. субстанция диборнола соответствует требованиям категории 2.2.

Одним из способов определения сроков годности ЛС является метод “ускоренного старения”, основанный на изучении стабильности ЛС при повышенной температуре.

Для установления стабильности порошка диборнола из каждой серии закладывали партии лекарственного вещества на хранение в банках из темного стекла, закрытых полиэтиленовыми пробками с навинчивающимися крышками, в термостат при температуре 60 °С. Затем через каждые 11 сут (период, эквивалентный 6 мес хранения при комнатной температуре) проводили контроль диборнола по следующим параметрам качества субстанции: “Температура плавления”, “Цветность растворов”, “Посторонние примеси”, “Количественное определение”. Проведенный анализ 6 серий субстанций показал, что срок экспериментального хранения порошка диборнола составляет не менее 2 лет.

Порошок диборнола необходимо хранить в хорошо закупоренной таре, в защищенном от света месте, так как вещество, имея в своей структуре фенольный гидроксил, способно к окислению под действием кислорода воздуха и света.

Таким образом, на основании проведенных исследований разработана стандартизация новой фармацевтической субстанции — диборнола, позволяющая осуществлять контроль ее качества.

#### Результаты количественного определения субстанции диборнола

Навеска, г	Оптическая плотность	Содержание, %	Метрологическая характеристика
0,0550	0,8024	101,03	$\bar{X} = 99,76 \%$
0,0532	0,7627	99,28	$S^2 = 1,16$
0,0502	0,7382	101,84	$S = 1,08$
0,0499	0,7127	98,91	$S_{\bar{x}} = 0,34$
0,0536	0,7741	100,01	$P = 0,95$
0,0520	0,7482	99,64	$T(P, f) = 2,26$
0,0504	0,7218	99,18	$\Delta X = 2,44$
0,0497	0,7070	98,51	$X \pm \Delta X =$
0,0527	0,7564	99,40	$X \pm 2,44 \%$
0,0520	0,7587	101,04	$\Delta \bar{X} = 0,71$
			$\bar{X} \pm \Delta \bar{X} =$
			$99,76 \% \pm 0,71 \%$
			$\varepsilon = 2,45 \%$
			$\bar{\varepsilon} = 0,7 \%$

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Y. Ruixing, R. Al-Ghazali, L. Wenwu, W. Jinzhen, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **66**(7), 549 – 558 (2006).
2. S. Merat, M. Aduli, R. Kazemi, et al., *Dig. Dis. Sci.*, **53**(8), 2246 – 2250 (2008).
3. И. С. Иванов, *Тез. докл. конференции “Актуальные проблемы экспериментальной и клинической фармакологии”*, Томск (2007), сс. 35 – 37.
4. Патент РФ 2347561 (2007).
5. М. Б. Плотников, В. И. Смольякова, И. С. Иванов и др., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **145**(3), 296 – 298 (2008).
6. И. Ю. Чукичева, А. В. Кучин, *Рос. хим. журн.*, **48**(3), 21 – 36 (2004).
7. *The United States Pharmacopeia XXIX* (2005).
8. *British Pharmacopeia* (2004).
9. *European Pharmacopeia* (2002).

10. *Государственная фармакопея России*, Медицина, Москва (2007).
11. Т. Н. Плиев, *Молекулярная спектроскопия*, т. 2, Иристон, Владикавказ (2001).
12. *Государственная Фармакопея СССР XI*, вып. 1. Общие методы анализа, Медицина, Москва (1987).
13. *Государственная Фармакопея СССР XI*, вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье, Медицина, Москва (1990).

Поступила 30.04.09

## DEVELOPING METHODS FOR ANALYSIS OF NEW HINDERED PHENOL DIBORNOL AS PHARMACEUTICAL SUBSTANCE

E. A. Krasnov<sup>1</sup>, E. E. Nazmutdinova<sup>1</sup>, I. S. Ivanov<sup>2</sup>, I. Yu. Chukicheva<sup>3</sup>, A. V. Kuchin<sup>3</sup>, and M. B. Plotnikov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Siberian State Medical University, Tomsk, Russia;

<sup>2</sup> Institute of Pharmacology, Tomsk Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, Russia;

<sup>3</sup> Institute of Chemistry, Komi Scientific Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russia

Procedures for the quality control of a new pharmaceutical substance, 4-methyl-2,6-diisobornolphenol (dibornol), have been elaborated.

**Key words:** dibornol substance, methods of analysis