

## РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ВЕЩЕСТВА Na-CPAH, ОБЛАДАЮЩЕГО НЕЙРОТРОПНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Макарова Е. А.<sup>1</sup>, Сидуллина С. А.<sup>1</sup>, Семина И. И.<sup>1</sup>, Тарасова Р. И.<sup>2</sup>, Муштафин Р. И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ГБОУ ВПО Казанский государственный медицинский университет; <sup>2</sup> ГБОУ ВПО Казанский государственный технологический университет, Казань, Россия (420012, г. Казань ул. Бутлерова, 41), e-mail: [live03@yandex.ru](mailto:live03@yandex.ru)

Изучены основные физико-химические свойства нового биологически активного вещества Na-CPAH класса фосфорилацетогидразидов с нейротропной активностью, и на их основе разработаны методики определения подлинности и количественного содержания. Исследованы окислительно-восстановительные реакции Na-CPAH с известными окислителями, предложена высокочувствительная реакция с перманганатом калия. Показана необходимость использования комплекса химических и физико-химических методов для подтверждения подлинности Na-CPAH: качественные реакции на функциональные группы, параметры ИК- и УФ-спектров поглощения. Изучены УФ- и ИК-спектры поглощения Na-CPAH, выделены характеристические полосы основных функциональных групп Na-CPAH; предложена методика определения подлинности по ИК-спектру поглощения. Найдены оптимальные условия спектрофотометрического определения Na-CPAH в субстанции. Разработана методика количественного анализа субстанции Na-CPAH методом УФ-спектрофотометрии; определены оптимальные условия проведения количественного определения, установлено, что концентрации рассчитываются по удельному показателю поглощения, по раствору стандартного образца или по калибровочной кривой. Относительная ошибка определения составляет для водных растворов не более  $\pm 0,72\%$ .

Ключевые слова: Na-CPAH, фосфорилацетогидразиды, нейротропная активность, качественный анализ, количественное определение, УФ-спектрофотометрия, ИК-спектроскопия.

## DEVELOPMENT OF PROCEDURES FOR QUALITY CONTROL OF A NEW BIOACTIVE SUBSTANCE Na-CPAH WITH NEUROTROPIC ACTIVITY

Makarova E. A.<sup>1</sup>, Sidullina S. A.<sup>1</sup>, Semina I. I.<sup>1</sup>, Tarasova R. I.<sup>2</sup>, Moustafin R. I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kazan State Medical University; <sup>2</sup>Kazan State Technological University, Kazan, Russia (420012, Kazan, Butlerov Street, 41) e-mail: [live03@yandex.ru](mailto:live03@yandex.ru)

We have studied the main physicochemical properties of a new bioactive substances Na-CPAH, which belongs to a class of phosphorylaceto-hydrazides, with neurotropic activity. Based on these properties, we have developed methods of determining the qualitative and quantitative content. Oxidation-reduction reactions of Na-CPAH with known oxidants were suggested by high-sensitivity reaction with potassium permanganate. Furthermore, there was shown the necessity to use a complex of chemical and physicochemical methods to verify the authenticity of Na-CPAH: qualitative reaction on functional groups, parameters of IR - and UV-absorption spectra. We studied its' UV and IR absorption spectra, highlighted the characteristic bands of the major functional groups; and suggested the methodology of determining the authenticity of Na-CPAH by the IR absorption spectrum. The optimal conditions for spectrometric determination of Na-CPAH in substance were found. The method was developed for the quantitative analysis of the substance Na-CPAH of UV-spectrometry; The optimal conditions for the quantitative determination were suggested and it was found that concentration can be calculated by the index of absorption, as well as sucrose standard sample or calibration curve. The relative error in determination is not more than  $\pm 0,72\%$ .

Key words: Na-CPAH, phospholylaceto-hydrazides, neurotropic activity, qualitative analysis, quantitative analysis, UV-spectrometry, IR-spectroscopy.

Нейродегенеративные заболевания являются одними из наиболее распространенных заболеваний человечества, проявляющиеся в виде снижения умственных способностей и часто приводящие к инвалидизации. Трудность лечения нейродегенеративных заболеваний придает особую актуальность проблеме поиска новых нейротропных препаратов с целью внедрения в медицинскую практику [6].

Ранее на кафедре фармакологии Казанского ГМУ были изучены препараты класса фосфорилацетогидразидов, обладающие широким спектром психотропной активности; детально исследованы препараты «КАПАХ» и «Фосфабензид», разработаны методики контроля их качества [4,5].

Продолжением исследований биологической активности фосфорилацетогидразидов стало изучение нового биологически активного вещества – натриевой соли ацетилгидразино-4-хлорфенилфосфиновой кислоты (Na-CPAH), синтезированного на кафедре органической химии Казанского НИТУ.

Фармакологами КазГМУ установлена низкая токсичность, высокая антидепрессивная и мнемотропная активность Na-CPAH, превосходящая активности препаратов «КАПАХ» и «Фосфабензид» [3].

Для введения в медицинскую практику нового БАВ, кроме параметров эффективность и безопасность, необходимо также разработать надежные методики контроля качества. В современном фармацевтическом анализе органических лекарственных веществ широко применяются физико-химические методы, такие как УФ-, ИК-спектроскопия, позволяющие проводить идентификацию лекарственных веществ, оценивать чистоту и количественное содержание по фармакологически активной части молекулы [1].

Цель настоящего исследования – разработать оптимальные методики качественного и количественного определения БАВ Na-CPAH.

**Материалы и методы.** В качестве объекта исследования использовалось БАВ Na-CPAH. По внешнему виду это аморфный порошок кремового цвета, без запаха и вкуса; легко растворим в воде, практически не растворим в эфире, хлороформе и спирте.

Подлинность вещества Na-CPAH устанавливали физико-химическими методами: ИК - и УФ-спектрофотометрией, рекомендованными ГФ XII.

ИК-спектры снимали в таблетках калия бромида на ИК-спектрометре фирмы "Bruker" VECTOR 22 (рис. 1).

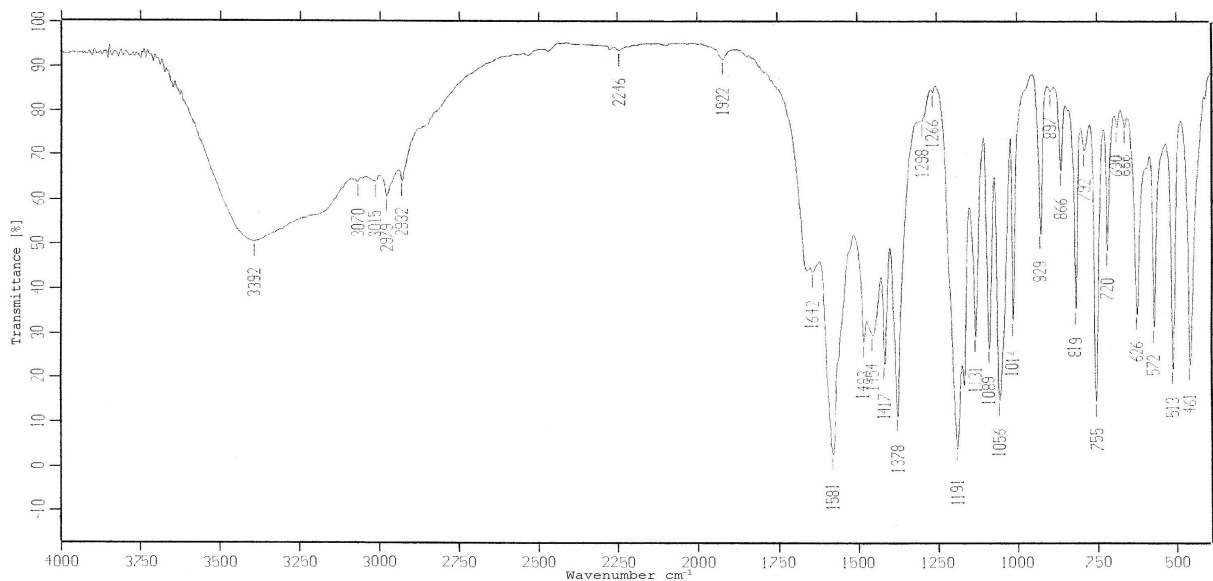
УФ-спектры поглощения снимали на двухлучевом регистрирующем спектрофотометре Lambda 25 («Perkin Elmer», США) с использованием сервисного пакета программ «Perkin Elmer UV WinLab 5.2.0.0646 / Lambda 25 1.27»."

Помимо физико-химических методов изучены окислительно-восстановительные реакции Na-CPAH по гидразидной группе. В качестве редокс-реактивов на Na-CPAH нами исследованы растворы йода, калия перманганата и серебра нитрата. Для объективной оценки, исследования проводились параллельно с испытуемым и контрольным растворами. Определение чувствительности реакций обнаружения Na-CPAH проводили визуально и выражали в мкг/мл вещества в пробе.

Количественное содержание Na-CPAN в субстанции определяли методом прямой УФ-спектрофотометрии на регистрирующем спектрофотометре Lambda 25 («Perkin Elmer», США).

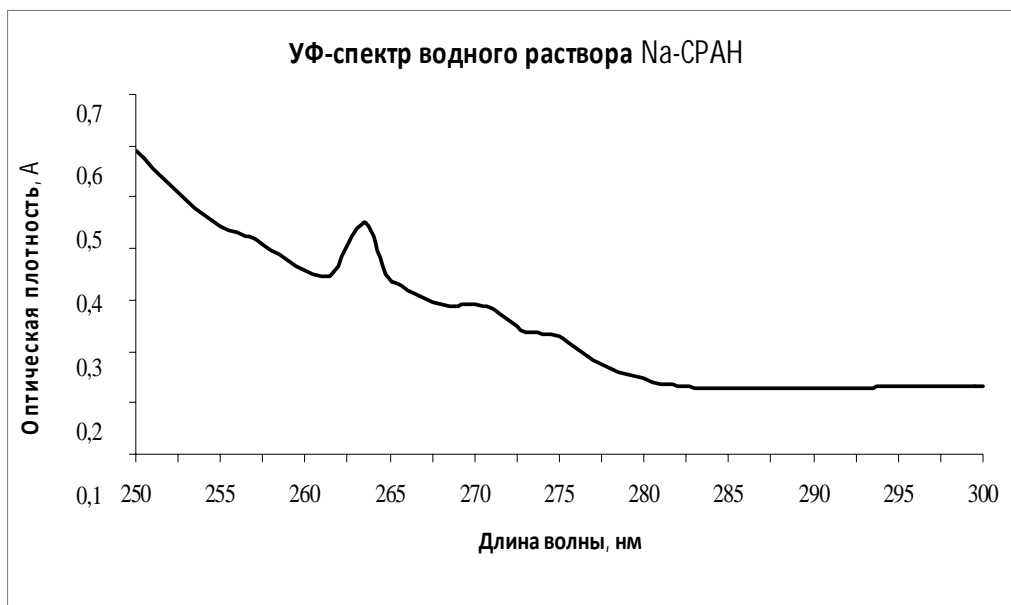
Статистическая обработка результатов количественного определения проводилась по методике, рекомендованной ГФ XI [2].

**Результаты исследования и их обсуждения.** ИК-спектр Na-CPAN (рис.1) имеет характеристические полосы поглощения следующих групп: фосфорильная P=O (1191 см<sup>-1</sup>), карбонильная C=O (1642, 1454 см<sup>-1</sup>), гидразидная NHNH<sub>2</sub> (3392 см<sup>-1</sup>).



**Рис. 1. ИК-спектр Na-CPAN**

УФ-спектр поглощения 0,02 % раствора субстанции в области от 250 до 300 нм имеет максимумы поглощения при 263,270 и 275 нм, что объясняется электронными переходами в ароматических кольцах (рис. 2).



**Рис. 2. УФ-спектр водного раствора Na-CPAN**

Качественные реакции (на гидразидную группу) показали, что исследуемое БАВ обесцвечивает раствор йода, перманганата калия в кислой среде, а с аммиачным раствором нитрата серебра при нагревании образует серый осадок серебра в виде серебряного зеркала. Реакция с перманганатом калия, как наиболее чувствительная, рекомендована нами в качестве реакции подлинности.

*Методика:* К 0,02 г субстанции прибавляют 1 мл воды и 0,25 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 %. При прибавлении нескольких капель 0,1 % раствора перманганата калия происходит обесцвечивание раствора.

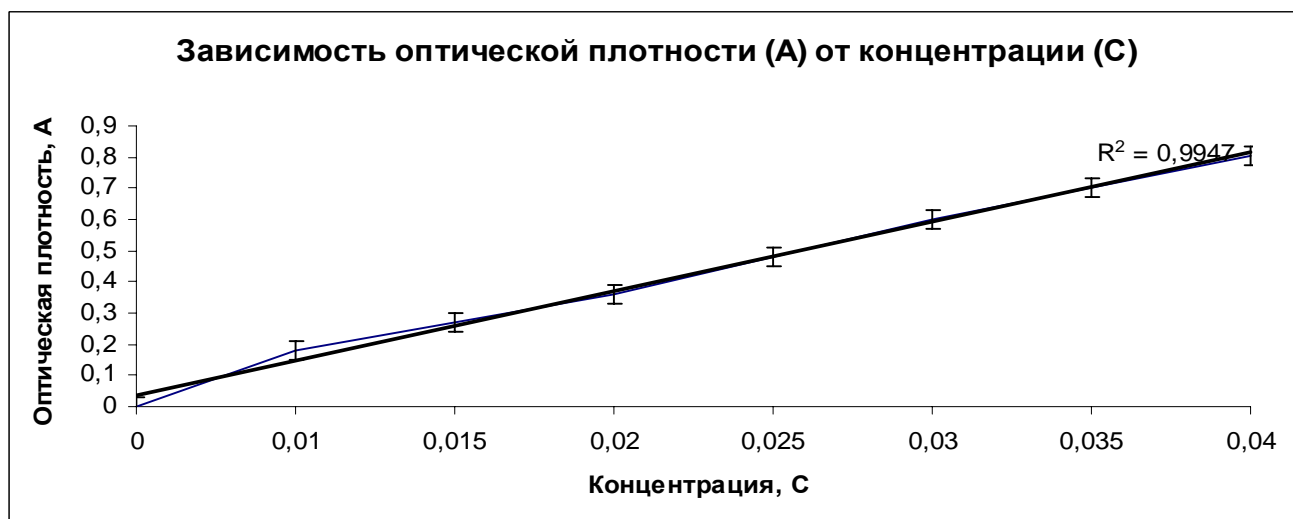
*Чувствительность реакции* 50 мкг/мл

Для количественного анализа был выбран максимум поглощения при длине волны  $263 \pm 2$  нм (рис. 2). Изучение зависимости между оптической плотностью и концентрацией раствора Na-CPAN показало, что она имеет линейный характер, значение оптической плотности укладываются в интервал 0,2 – 0,8 мг/мл (табл.1), значение коэффициента корреляции составляет 0,9947, что позволяет использовать данный градуировочный график для количественного определения Na-CPAN (рис. 2).

**Таблица 1. Определение удельного показателя поглощения водных растворов Na-CPAN**

C, %	Асп.	$E_{1\text{см}}^{1\%}$	Метрологические Характеристики
0,01	0,18103	18,1	$f=6$ $\bar{x}=19,06$ $S^2=1,05$ $S=1,025$ $S_{\bar{x}}=0,39$ $R=2,05$ $Q(95\%,7)=0,51$ $\varepsilon=\pm 1,14\%$
0,015	0,2687	17,91	
0,02	0,36134	18,06	
0,025	0,4791	19,16	
0,03	0,6021	20,07	
0,035	0,7003	20,01	
0,04	0,80622	20,15	
$E_{1\text{см}}^{1\%}$ ср.= 19,07			

На основе полученных результатов рассчитывали значения удельного показателя поглощения Na-CPAN (табл. 1). Рассчитанный удельный показатель поглощения водных растворов Na-CPAN при длине волны  $263\pm 1$  нм равен 19,07



**Рис. 3. Определение подчиненности раствора Na-CPAN в водных растворах основному закону светопоглощения**

Количественное определение Na-CPAN проводили с помощью калибровочного графика, удельного показателя поглощения и сравнением оптических плотностей стандартного и анализируемого растворов.

В качестве стандарта использовали 0,02 % водный раствор Na-CPAN с известным содержанием основного вещества. Оценку чистоты Na-CPAN и идентификацию

образующихся при его синтезе побочных продуктов проводили методом тонкослойной хроматографии с использованием стандартных пластинок «Sorbfil- UV-254».

Для объективной оценки исследования проводились параллельно с испытуемым и контрольным растворами.

*Количественное определение. Методика:*

Испытуемый раствор. Около 0,02 г субстанции (точная навеска), помещают в мерную колбу объемом 100 мл, растворяют в воде очищенной, доводят объем раствора тем же растворителем до метки.

Стандартный раствор. Около 0,02 г субстанции (точная навеска) стандартного образца Na-CPАН, помещают в мерную колбу объемом 100 мл, растворяют в воде очищенной, доводят объем раствора тем же растворителем до метки.

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора и стандартного раствора на спектрофотометре в максимуме поглощения при 263 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

**Таблица 2. Результаты количественного определения Na-CPАН**

№ п/п	Взято, г	Найдено, %		
		По удельному показателю поглощения	По раствору стандартного образца	По калибровочной кривой
1.	0,0185	99,16	99,08	99,36
2.	0,0190	99,23	99,21	99,21
3.	0,0195	99,12	99,68	98,73
4.	0,02	99,43	99,39	98,9
5	0,0205	99,36	99,18	99,4
ε		±0,7%	±0,74%	±0,92%

**методом УФ-спектрофотометрии**

Согласно полученным данным с равной эффективностью можно использовать все методы расчета концентрации исследуемого вещества. Относительная погрешность определения составляет ± 0,92 %.

При оценке воспроизводимости результатов количественного содержания Na-CPАН методом УФ-спектрофотометрии на основе разработанной нами методики установлено, что выборка признана однородной и не отягощенной грубой ошибкой. Метрологические характеристики представлены в таблице 3.

Таким образом, разработаны методики идентификации нового БАВ с выраженной нейротропной активностью Na-CPАН с применением качественных и количественных

методов анализа. Установлена возможность применения метода УФ-спектрофотометрии для количественной оценки субстанции Na-CPAN и разработана методика.

**Таблица 3. Данные статистической обработки полученных результатов**

N	f	$\bar{x}$	$S^2$	S	$S_{\bar{x}}$	R	Q(P,n)	$\epsilon$
5	4	99,26	0,02	0,14	0,06	0,2	Q(95%,5)=0,64	$\pm 0,4\%$
5	4	99,3	0,05	0,23	0,1	0,1	Q(95%,5)=0,64	$\pm 0,64\%$
5	4	99,08	0,06	0,26	0,1	0,24	Q(95%,5)=0,64	$\pm 0,72\%$

### **Выводы**

1. Изучены физико-химические свойства нового БАВ Na-CPAN с нейротропной активностью, на основе которых установлена его подлинность (УФ-, ИК-спектры, цветные реакции с перманганатом калия).
2. Разработана методика количественного определения Na-CPAN методом УФ-спектрофотометрии.

### **Список литературы**

1. Барковский В. Ф., Городенцева Т. Б., Топорова Н. Б. Основы физико-химических методов анализа. – М., 1983. – 236 с. (номер 7).
2. Государственная Фармакопея СССР. – 11-е изд. Т.1. – М.: Медицина, 1987. – 336 с.
3. Макарова Е. А., Тарасова Р. И., Семина И. И., Фаттахов Ш. А., Шиловская Е. В., Пашина И. П., Байчурина А. З., Воскресенская О. В., Гараев Р. С.// Фундаментальные исследования, ж. – 2012. – Т. 2, №8 (Ч. 2). – 2012. – С. 470-473.
4. Тарасова Р. И., Москва И. И. Биологически активные производные фосфорилированных карбоновых кислот // ЖОХ. – 1997. – Т. 67, вып. 9. – С. 1483-1496.
5. Тарасова Р. И., Семина И. И., Воскресенская О. В., Ларина М. Л., Мухутдинов Э. А., Литвинов И. А., Губайдуллин А. Т. Структура и биологическое действие потенциальных психотропных средств фосеназида и КАПАХ. Сравнительный анализ // Хим.-фарм. журнал. – 2007. – Т. 41, № 2. – С. 11-14.
6. Яхно Н. Н. Когнитивные нарушения в неврологической клинике // Неврол. журнал. – 2006. – 11 (прил. 1). С. 4–12.

### **Рецензенты:**

Егорова С. Н., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой ФПК и ППС ГБОУ ВПО «КазГМУ», г. Казань.

Камаева С. С., д.м.н., доцент кафедры технологии лекарств ГБОУ ВПО «КазГМУ», г. Казань.