

УДК 615.07

СТАНДАРТИЗАЦИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ КАТИОННОГО ПРОИЗВОДНОГО БАКТЕРИОПУРПУРИНИМИДА ДЛЯ АНТИМИКРОБНОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

А.М. Фролова^{1*}, Д.А. Графов¹, В.С. Тюкова^{2,3}, Е.В. Ворфоломеева^{2,3},
Н.А. Кирьянов^{2,3}, Е.В. Филоненко⁴, А.В. Панов^{2,3}, М.А. Грин³, С.А. Кедик^{2,3}

Резюме. В данной работе представлены основные показатели, регламентируемые Государственной фармакопеей РФ XIII издания [1], которые могут применяться для стандартизации катионного производного бактериопурпуринимид. Анализ данного соединения проводится с целью его последующего использования в качестве фармацевтической субстанции (ФС), преимущественным путём применения которой является антимикробная фотодинамическая терапия (ФДТ).

Ключевые слова: стандартизация, контроль качества, фармацевтическая субстанция, антимикробная фотодинамическая терапия, катионное производное, бактериопурпуринимид.

STANDARDIZATION OF CATIONIC DERIVATIVE OF BACTERIOPURPURINIMID AS PHARMACEUTICAL SUBSTANCE FOR ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY

A.M. Frolova^{1*}, D.A. Grafov¹, V.S. Tukova^{2,3*}, E.V. Vorfolomeeva^{2,3}, N.A. Keryanov^{2,3}, E.V. Feelonenko⁴, A.V. Panov^{2,3}, M.A. Green³, S.A. Kedek^{2,3}

Abstract. In this paper key indicators due to Pharmacopoeia XIII [1] that can be used to standardize the cationic derivative of bacteriopurpurinimid as pharmaceutical substance (PS) are presented. The prime application of this compound to be a photosensitizer for antimicrobial photodynamic therapy (PDT).

Keywords: standardization, quality control, pharmaceutical substance, antimicrobial photodynamic therapy, cationic derivative, bacteriopurpurinimid.

1 – ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева» (РХТУ им. Д.И. Менделеева), 125480, Россия, г. Москва, 125047, Миусская пл., д. 9

2 – ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (МИТХТ), 119571, Россия, г. Москва, Вернадского пр-т, д. 78

3 – ЗАО «Институт фармацевтических технологий», 121353, Россия, г. Москва, Сколковское шоссе, д. 21/32, стр.1

4 – ФГБУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена» (МНИОИ им. П.А. Герцена), Россия, 125284, г. Москва, 2-й Боткинский пр., д. 3

1 – D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, 9, Miusskaya Pl., Moscow, 125480, Russia

2 – Technological university of Moscow, 78, Vernadskogo Ave, Moscow, 119571, Russia

3 – LLC «Institute of pharmaceutical technology», 21/32, Skolkovskoe highway, Moscow, 121353, Russia

4 – P.A. Gercen scientific-research oncological institute of Moscow, 3, 2-d Botkinskiy proezd., Moscow, 125284, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: anastasiyfrolova1994@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

К настоящему времени известно более 10 тыс. природных и синтетических антибиотиков [2], которые проявляют бактерицидную активность, ингибируя биосинтез белков клеточных стенок у бактерий на этапе их поперечного сшивания. Однако на данный момент в отношении большого количества активных соединений бактерии выработали обособленный механизм защиты [3].

Антимикробная ФДТ является достаточно новым, перспективным методом лечения заболеваний, вызванных разными видами бактерий. Эффективность метода показана как на грамотрицательных, так и на грамположительных бактериях,

а главным отличием от лечения антибиотиками является отсутствие резистентности к фотосенсибилизатору [4].

Порфирины и родственные соединения находят широкое применение в различных областях науки, техники и медицины благодаря их уникальным фотофизическим свойствам [5]. Особое место среди них занимают природные соединения, в частности производные хлорофилла и бактриохлорофилла, которые активно используются в антимикробной ФДТ и флуоресцентной диагностике (ФД) рака и доброкачественных новообразований.

На основе знаний о строении патогенных микроорганизмов [6] был сделан вывод, что универсальными фотосенсибилизаторами для

антимикробной ФДТ являются молекулы с положительными зарядами. Были синтезированы фотосенсибилизаторы, содержащие пиридиновые группы, на основе порфиринов, фталоцианинов и фуллерена C₆₀ [7]. Одним из полученных фотосенсибилизаторов является катионное производное бактериопурпуринида (БПИ).

В литературе описываются различные методы синтеза фотосенсибилизаторов на основе катионных производных [8, 9].

В данной работе представлены исследования, которые позволяют стандартизовать катионное производное БПИ для его дальнейшего применения в качестве ФС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Согласно общей фармакопейной статье (ОФС) 1.1.0006.15 обязательными показателями, регламентирующими качество ФС, являются описание, растворимость, подлинность, родственные примеси, потеря в массе при высушивании, сульфатная зола, тяжелые металлы, остаточные органические растворители, микробиологическая чистота и количественное определение.

Стандартизации подверглось шесть лабораторных серий вещества.

Визуально было установлено, что ФС на основе катионного производного БПИ представляет собой кристаллический порошок от багрового до темно-бордового цвета.

При проведении испытания согласно ОФС 1.2.1.0005.15 было установлено, что ФС на основе катионного производного БПИ растворима в хлороформе, этаноле, малорастворим в этилацетате, практически нерастворим в воде. Данные о растворимости испытуемого вещества используются при подборе растворителей при проведении дальнейших испытаний по параметрам стандартизации.

Показатель подлинности вводится для установления достоверной природы исследуемого вещества, его полного структурного соответствия предоставляемой ФС. Для установления подлинности ФС предлагается использовать один из двух методов: метод спектроскопии ядерного магнитного резонанса на ядрах ¹H (¹H-ЯМР-спектроскопия) или метод абсорбционной спектрофотометрии в ультрафиолетовой (УФ) и видимой областях. В рамках исследования было решено проанализировать испытуемый образец обоими предложенными методами с целью получения более подтвержденного результата, позволяющего обосновать подлинность катионного производного БПИ.

Установление подлинности методом ¹H-ЯМР-спектроскопии (ОФС.1.2.1.1.0007.15) представляет собой высокочувствительный, точный метод анализа, позволяющий получить более полное и достоверное

представление о строении химического соединения, тем самым подтвердив его подлинность. ¹H-ЯМР-анализ осуществляют путем сравнения спектра испытуемого образца со спектром стандартного образца или с опубликованным эталонным спектром. Спектры стандартных и испытуемых образцов должны быть получены в одинаковых условиях. Пики в сравниваемых спектрах должны совпадать по положению, интегральной интенсивности и мультиплетности, значения которых следует приводить при описании спектров (отклонения значений химического сдвига испытуемого и стандартных образцов должны быть в пределах ±0,1 м.д.)

На ¹H-ЯМР-спектре раствора испытуемого образца должны наблюдаться характерные сигналы положения, интегральные интенсивности, мультиплетности и химические сдвиги сигналов которых должны соответствовать: 10,14 (д, J15Hz, 1H, пиридин); 9,28 (м, J2Hz, пиридин); 9,11 (с, 10-H); 8,60 (д, J3Hz, 5-H); 8,48 (д, J6Hz, 20-H); 8,40 (т, J6Hz, 1H, пиридин); 5,05 (м, 17-H); 4,73 (с, N-CH₃, пиридин); 4,16 (м, 18-H, 7-H); 3,92 (м, 8-H); 3,49 (с, 12-CH₃); 3,45 (с, 17⁵-CH₃); 3,43 (с, 2-CH₃); 3,09 (с, 3²-CH₃); 2,54 (м, 8¹-CH₂); 2,33 (м, 17²-CH₂); 2,29 (м, 17¹-CH₂); 1,94 (м, 7-CH₃); 1,71 (д, J9Hz, 18-CH₃); 0,99 (т, J7Hz, 8²-CH₃); -0,3 (с, NH); -0,6 (с, NH).

На рисунке 1 представлен ¹H-ЯМР-спектр катионного производного БПИ.

Около 50 мг образца растворяли в дейтерированном хлороформе («Химсервис», Россия), к которому добавляли тетраметилсилан (из каталога ChemBioTrade, 75-76-3) для калибровки химического сдвига. Далее образец переносили в ампулу для ЯМР диаметром 5 мм, укупоривали и вводили в магнит ЯМР-спектрометра Avance Bruker DPX-300 для регистрации спектра при 40 °С с рабочей частотой на протонах 300 МГц.

Менее трудоёмким и более распространённым методом подтверждения подлинности химического соединения является метод абсорбционной спектрофотометрии (ОФС.1.2.1.1.0003.15). Спектр поглощения раствора ФС в хлороформе должен иметь максимумы при 366±2 нм, 551±2 нм, 825±2 нм. УФ-спектры поглощения испытуемого раствора и раствора стандартного образца катионного производного БПИ, зарегистрированные при температуре 20 °С в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно хлороформа, в области длин волн от 190 до 900 нм должны иметь идентичные максимумы.

Около 100 мг (точная навеска) испытуемого образца помещали в мерную колбу, растворяли в хлороформе (х.ч., «ЛаборКомплект», Россия) и доводили до метки тем же растворителем (Раствор А). Аликвоту пробы 125 мкл помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили до метки хлороформом хлороформом (Раствор, Россия) (Раствор В). Спектр поглощения регистрировали на спектрофотометре СФ-104 фирмы «Аквилон» при термостатировании до 20 °С в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно хлороформа в области длин волн от 190 до 900 нм. На рисун-

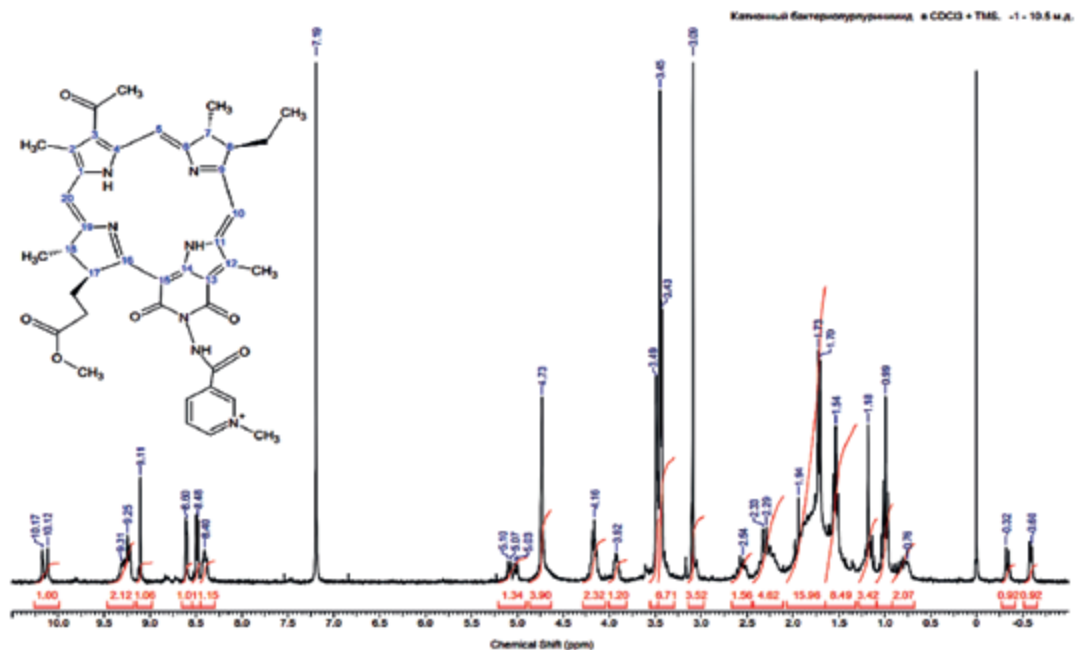


Рисунок 1. ¹H-ЯМР-спектр катионного производного БПИ

ке 2 представлен УФ-спектр катионного производного БПИ.

Идентификация родственных примесей проводится для осуществления контроля за наличием продуктов возможного разложения ФС и технологических примесей, возникновение которых обусловлено технологией производства. Примеси могут представлять собой соединения с установленным химическим строением (идентифицированные) и соединения, строение которых неизвестно (неидентифицированные). Параметры содержания родственных примесей в ФС устанавливаются в зависимости от их безопасности.

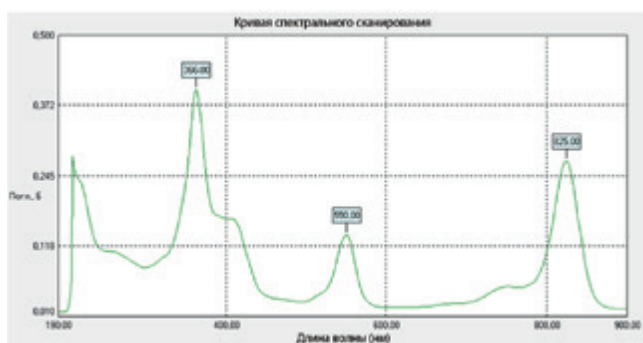


Рисунок 2. УФ-спектр катионного производного БПИ

Для контроля уровня примесей обычно используют хроматографические методы с использованием стандартных образцов и реже спектроскопические методы.

Определение родственных примесей в ФС проводят с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в соответствии с ГФ XIII, Т. 1, С. 496 с последующим расчётом при помощи

метода внутренней нормировки. Типичная хроматограмма испытуемого раствора представлена на рисунке 3.

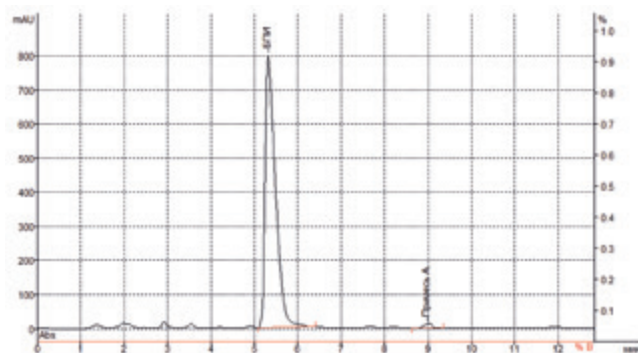


Рисунок 3. Типичная хроматограмма катионного производного БПИ, полученная в ходе анализа методом ВЭЖХ

Стандарт:

стандартный образец метилового эфира (N'-никотинил)-N-аминобактериопурпуринимида (98,4%, МТУ, Россия).

Реактивы:

- вода (Milli-Q);
- пентилсульфоната натрия (х.ч., «Диафарм СМ», Россия);
- ацетонитрил для ВЭЖХ (Scharlau, № AC03292500).

Подвижную фазу А получают следующим образом. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 870+0,5 мг пентилсульфоната натрия, приливают 100–200 мл дистиллированной воды, тщательно пере-

мешивают и доводят объём раствора до метки дистиллированной водой. Доводят pH до 3,5 ортофосфорной кислотой.

Для получения подвижной фазы В смешивали 400 мл подвижной фазы А и 600 мл ацетонитрила. Полученный раствор фильтровали и дегазировали.

В качестве холостой пробы использовали подвижную фазу.

Изначально для приготовления испытуемого раствора брали навеску 5,0 мг испытуемого образца вследствие отсутствия достаточного количества вещества после синтеза, помещали в мерную пробирку «Эппендорф» вместимостью 1,5 мл, растворяли в 0,5 мл ацетонитрила и доводили ПФ А до метки 1 мл. Полученный раствор тщательно перемешивали и выдерживали при комнатной температуре 5 мин. Концентрация раствора – 5,0 мг/мл.

В дальнейшем благодаря более точному проведению синтеза появилась возможность получать испытуемое вещество в больших количествах. Поэтому для приготовления испытуемого раствора брали навеску 50,0 мг испытуемой субстанции, помещали в мерную колбу объемом 10 мл, растворяли в 5 мл ацетонитрила и доводили ПФ А до метки. Полученный раствор тщательно перемешивали и выдерживали при комнатной температуре 5 мин. Концентрация раствора оставалась неизменной – 5,0 мг/мл.

Хроматографические условия.

- Колонка Luna C18(2), размер зерна – 5 мкм, 150×4,6 мм (Phenomenex).
- Соотношение подвижных фаз А:В – 40:60.
- Скорость потока – 1 мл/мин.
- Используется изократический режим элюирования.
- Детектор спектрофотометрический.
- Длина волны – 360 нм.
- Температура колонки – 30 °С.
- Количество образца – 20 мкл.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

1. Эффективность колонки по пику метилового эфира (N'-никотинил)-N-бактериопурпуринамида на хроматограммах стандартного раствора должна составлять не менее 5000 теоретических тарелок;
2. Относительное стандартное отклонение площадей пиков метилового эфира (N'-никотинил)-N-бактериопурпуринамида на хроматограммах стандартного раствора № 1 должно составлять не более 5%.

В хроматограф, выведенный на рабочий режим, вводили раствор холостой пробы. На хроматограмме

отмечали системные пики. В хроматограф, выведенный на рабочий режим, вводили испытуемый раствор. Идентифицировали компоненты и определяли их площади. Системные пики, присутствующие на хроматограмме раствора холостой пробы, не учитываются. Определяли параметры пригодности системы. Каждый из растворов вводили не менее 5 раз.

Метод внутренней нормализации предполагает, что пики всех возможных компонентов смеси зафиксированы на хроматограмме и сумма их площадей (S_i) равна 100%. Различия в чувствительности детектора к разным компонентам учитываются введением поправочных коэффициентов (K_i). Расчет проводили по формуле:

$$X(\%) = \frac{S_i \cdot K_i}{\sum_{i=1}^n (S_i \cdot K_i)} \cdot 100,$$

где n – число компонентов смеси; S_i – площадь хроматографического пика; K_i – поправочные коэффициенты для каждого i -го компонента.

В настоящее время катионное производное БПИ находится на стадии доклинических исследований, продолжается активное изучение свойств его возможных примесей. На данный момент установлено, что определяемая родственная примесь не является высокотоксичной, представляя собой исходный компонент последней стадии синтеза катионного производного БПИ. В рамках проводимых исследований эмпирически при соблюдении вышеописанных условий ВЭЖХ анализа было выявлено, что в катионном производном БПИ количественное содержание примеси метилового эфира (N'-никотинил)-N-аминобактериопурпуринамида должно быть не более 0,5%, а количество неидентифицированных примесей – не более 2%.

Испытание, проводимое для определения потери в массе при высушивании, вводят для контроля уровня влажности и возможного содержания летучих веществ в субстанции (растворители, используемые в синтезе).

Точную навеску испытуемого вещества помещали в предварительно высушенный до постоянной массы и взвешенный бюкс. Пробу сушили с открытой крышкой бюкса в защищенном от света месте до постоянной массы. Открытый бюкс вместе с крышкой помещали в эксикатор для охлаждения на 50 мин, после чего закрывали крышкой и взвешивали. Последующие взвешивания проводили после каждого часа дальнейшего высушивания до достижения постоянной массы.

Содержание сульфатной золы в ФС, как правило, не должно превышать 0,1%, что контролируется стандартным методом, описанным в фармакопейной статье ОФС.1.2.2.2.0014.15. Контроль содержания сульфатной золы позволяет судить о загрязненности ФС ионами металлов.

Фарфоровый тигель прокаливали при температуре 550–650 °С в течение 30 мин, охлаждали в лабораторном эксикаторе фирмы SciLabware (Великобритания) над силикагелем (СТО 61182334-004-2011) и взвешивали по окончании прокаливания.

Точную навеску испытуемого вещества (около 1 г) помещали в предварительно прокаленный тигель, смачивали 1 мл серной концентрированной кислоты (х.ч., «ТРАНСКЕМИКЛ-экспресс», Россия) и осторожно (избегая сильного вспенивания вещества) нагревали на электрической плитке с закрытым нагревательным элементом и терморегулятором до обугливания. После охлаждения смачивали остаток 1 мл серной концентрированной кислотой и осторожно нагревали до удаления паров серной кислоты. Затем тигель помещали в лабораторную муфельную печь фирмы «Сикрон» и прокаливали при температуре 550–650 °С до тех пор, пока остаток полностью не превратился в пепел. По окончании прокаливания тигель охлаждали в эксикаторе фирмы SciLabware (Великобритания), взвешивали и рассчитывали процентное содержание остатка.

Определение предела содержания тяжелых металлов в ФС основано на максимальной суточной дозе препарата, произведенного из данной ФС, и длительности его возможного применения. Содержание тяжелых металлов в ФС не должно превышать 0,001% (ОФС.1.2.2.2.0012.15).

Готовили испытуемый раствор. Для этого зольный остаток, полученный после сжигания 1 г испытуемого образца в присутствии серной кислоты концентрированной, обрабатывали при нагревании на сетке 2 мл насыщенного раствора аммония ацетата (AppliChem, A4716,0250), нейтрализованного раствором натрия гидроксида («ТРАНСКЕМИКЛ-экспресс», Россия), прибавляли 3 мл воды дистиллированной и фильтровали в пробирку через беззольный фильтр, предварительно промытый 1% раствором уксусной кислоты («ТРАНСКЕМИКЛ-экспресс», Россия), а затем – горячей водой дистиллированной. Тигель и фильтр промывали 5 мл воды дистиллированной, пропуская её через тот же фильтр в ту же пробирку.

Приготовление эталонного раствора 1 состоит в том, что в тигель помещали серную концентрированную кислоту в количестве, взятом для сжигания испытуемого образца, и далее поступали, как с испытуемым образцом, но промывание тигля и фильтра производили лишь 3 мл воды дистиллированной, после чего к фильтрату прибавляли 2 мл стандартного раствора иона свинца с концентрацией 5 мкг/мл (ГСО 7252-96, «Уральский завод химических реактивов», Россия).

Готовили эталонный раствор 2. Для этого в тигель помещали серную кислоту концентрированную в количестве, взятом для сжигания испытуемого образца, и далее поступали, как с испытуемым образцом, но промывание тигля и фильтра производили лишь 3 мл воды дистиллированной, после чего к фильтрату при-

бавляли 2 мл стандартного раствора иона свинца с концентрацией 10 мкг/мл (ГСО 7252-96, «Уральский завод химических реактивов», Россия)

Контрольный раствор готовили так же, как и испытуемый раствор, но без испытуемого образца.

К полученным растворам прибавляли по 1 мл разведенной 30% уксусной кислоты («ТРАНСКЕМИКЛ-экспресс», Россия), 2 капли 2% раствора натрия сульфида, перемешивали и через 1 мин сравнивали окраску растворов. В сравниваемых растворах допустима слабая опалесценция от выделившейся серы.

При проведении испытания ФС на остаточные количества органических растворителей следует учитывать следующее. Содержание растворителей 1 класса токсичности всегда контролируется независимо от стадии их использования. Присутствие растворителей 2 класса токсичности обязательно должно контролироваться при их применении на последней стадии производства ФС, а для используемых не на последней стадии в нормативной документации должен быть предусмотрен контроль их остаточного содержания либо должно быть приведено обоснование отсутствия соответствующего контроля. В ФС контроль растворителей 3 класса токсичности необходим, если они используются на последней стадии производства.

Поскольку при синтезе катионного производного БПИ были использованы растворители 2 класса токсичности (пиридин, хлороформ) и растворитель с недостаточно обоснованной токсичностью (н-гексан), их остаточное количество должно контролироваться.

Определение остаточного содержания каждого из растворителей проводили с использованием газожидкостной хроматографии (ГЖХ).

Испытание для пиридина проводили на газовом хроматографе «Кристаллюкс-4000М» («Аквилон», Россия) с пламенно-ионизационным детектором. Разделение компонентов выполняли на колонке ZB-WAX с размером 30 м x 0,25 мм и номинальной толщиной пленки 0,25 мкм.

Реактивы:

этанол-ректификат (ГОСТ 5964-93).

Стандартный образец:

пиридин (№ L04893, AlfaAesar, Германия).

Для приготовления стандартного раствора в мерную колбу вместимостью 100 мл вносили 50 мг пиридина, прибавляли 80 мл этанола-ректификата, растворяли и доводили этанолом-ректификатом до метки. 1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили этанолом-ректификатом до метки.

Для приготовления испытуемого раствора в мерную колбу вместимостью 10 мл вносили 500 мг испытуемого образца, прибавляли 8 мл этанола-ректификата, растворяли и доводили этанолом до метки.

*Хроматографические условия:*Термостат при $t=35-300\text{ }^{\circ}\text{C}$.Температура колонки – $200\text{ }^{\circ}\text{C}$.Температура испарителя – $250\text{ }^{\circ}\text{C}$.Температура детектора – $260\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Газ-носитель – гелий.

Давление на входе в колонку – 10 psi .Деление потока – $1/10$.Расход водорода – 30 мл/мин .Расход воздуха – 300 мл/мин .Объем анализируемой пробы – $1,0\text{ мкл}$.Продолжительность анализа – 10 мин .

Перед началом испытания проводили проверку пригодности хроматографической системы. В хроматограф, выведенный на рабочий режим, последовательно вводили 5 раз стандартный раствор. Хроматографическая система считается пригодной для анализа при выполнении следующих условий:

- 1) эффективность колонки по пику пиридина на хроматограммах стандартного раствора составляет не менее 3000 теоретических тарелок;
- 2) хвостовой фактор для пика определяемого вещества на хроматограмме стандартного раствора составляет не более 2;
- 3) среднеквадратичное отклонение площади пика пиридина на 5 хроматограммах стандартного раствора составляет не более 5%.

Для определения остаточного содержания пиридина в ФС в колонку хроматографа последовательно вводили стандартный раствор и испытуемый раствор по 5 раз каждый.

Типичная хроматограмма испытуемого раствора представлена на рисунке 4.

Содержание пиридина в исследуемом образце (X , %) определяли по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot 10 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot 100 \cdot 50 \cdot a_1 \cdot 100} = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot P}{S_0 \cdot a_1 \cdot 500},$$

где S_1 – площадь пика примеси пиридина на хроматограмме испытуемого раствора; S_0 – площадь пика пиридина на хроматограмме стандартного раствора; a_1 – навеска испытуемого образца, мг; a_0 – навеска стандартного образца, мг; P – содержание основного вещества в стандартном образце, %.

Эмпирическим путём на данном этапе исследований было установлено, что содержание пиридина в ФС должно быть не более $0,02\%$ (200 ppm).

Испытание для хлороформа проводили на газовом хроматографе «Кристаллюкс-4000М» («Акви-

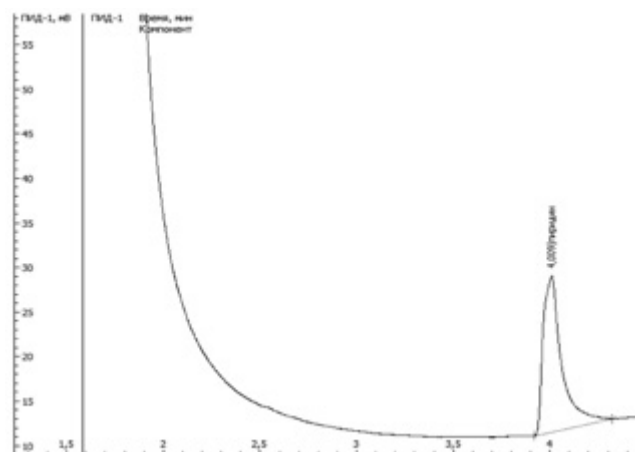


Рисунок 4. Типичная хроматограмма катионного производного БПИ, полученная в ходе анализа остаточного содержания пиридина методом ГЖХ

лон», Россия) с пламенно-ионизационным детектором. Разделение компонентов выполняли на капиллярной колонке SPB-624 (неподвижная фаза: 6% полицианопропилфенилсилоксана и 94% полидиметилсилоксана) размером $30\text{ м} \times 0,53\text{ мм}$ и номинальной толщиной пленки 3 мкм или аналогичной. Температура колонки программируется от $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (задержка 5 мин) до $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ со скоростью нагрева $12\text{ }^{\circ}\text{C/мин}$ (задержка 5 мин).

Реактивы:

метанол (х.ч., «Химреактив», Россия).

Стандартный образец:

хлороформ (х.ч., Merck, кат. № 102445).

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 60 мг стандартного образца хлороформа и растворяли в метаноле, объем раствора доводили тем же растворителем до метки и перемешивали. 1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили метанолом до метки, тщательно перемешивали. $0,1\text{ мл}$ полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл , перемешивали и доводили метанолом до метки. Раствор использовали свежеприготовленным.

Для приготовления испытуемого раствора в мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 10 мг (точная навеска) исследуемого вещества и растворяли в метаноле, объем раствора доводили тем же растворителем до метки и перемешивали. Раствор использовали свежеприготовленным.

*Хроматографические условия:*Температура инжектора – $150\text{ }^{\circ}\text{C}$.Температура детектора – $250\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Газ-носитель – азот.

Поток газа-носителя – 30 мл/мин .

Поток водорода – 30 мл/мин.

Поток воздуха – 300 мл/мин.

Объем вводимой пробы – 1 мкл.

Перед началом испытания проводили проверку пригодности хроматографической системы. Для этого в хроматограф вводили 5 раз стандартный раствор и записывали хроматограммы. Хроматографическая система считается пригодной для анализа при выполнении следующих условий:

- 1) для пика хлороформа относительное стандартное отклонение должно быть не более 5%;
- 2) коэффициент асимметрии должен быть не более 3;
- 3) эффективность колонки по пику хлороформа не менее 5000 теоретических тарелок.

Для определения остаточного содержания хлороформа в анализируемом образце в колонку хроматографа последовательно вводили стандартный раствор и испытуемый раствор по 5 раз каждый.

Типичная хроматограмма испытуемого раствора представлена на рисунке 5.

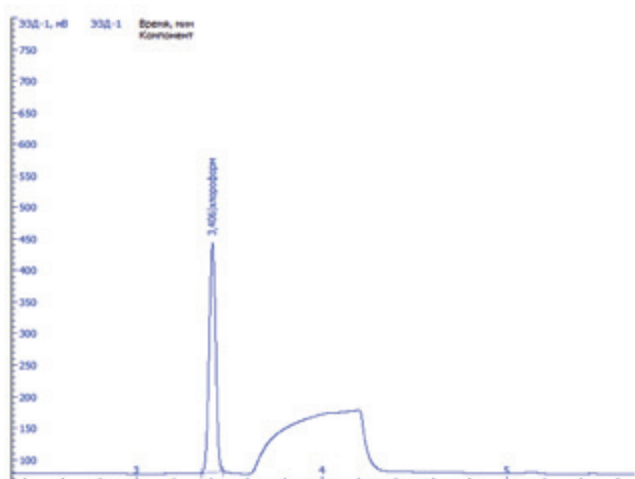


Рисунок 5. Типичная хроматограмма катионного производного БПИ, полученная в ходе анализа остаточного содержания хлороформа методом ГЖХ

Содержание хлороформа в исследуемом соединении (X) в процентах рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot 100 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a_1 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100} = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot P}{S_0 \cdot a_1 \cdot 10000},$$

где S_1 – площадь пика хлороформа на хроматограмме испытуемого раствора; S_0 – площадь пика хлороформа на хроматограмме стандартного раствора; a_1 – навеска испытуемого образца, мг; a_0 – навеска стандартного образца, мг; P – содержание хлороформа в стандартном образце, %.

Эмпирическим путём на данном этапе исследований было установлено, что содержание хлороформа в ФС должно быть не более 0,006% (60 ppm).

Для определения содержания *n*-гексана в исследуемом соединении применяли газовый хроматограф «Кристаллюкс-4000М» («Аквилон», Россия) с пламенно-ионизационным детектором. Разделение компонентов выполняли на капиллярной колонке SPB-624 (неподвижная фаза: 5% полицианопропилфенилсилоксана и 95% полидиметилсилоксана) размером 30 м x 0,53 мм и номинальной толщиной пленки 3 мкм или аналогичной. Температура колонки программируется от 40 °С (задержка 5 мин) до 150 °С со скоростью нагрева 5 °С/мин (задержка 5 мин).

Реактивы:

этанол-ректификат (ГОСТ 5964-93).

Стандартный образец:

n-гексан (ч.д.а., Acros CAS N: 110-54-3).

Для приготовления стандартного раствора в мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 290 мг (точная навеска) *n*-гексана и растворяли в 100 мл этанола-ректификата, объем раствора доводили тем же растворителем до метки и перемешивали. 1,0 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, и доводили объем раствора до метки этанолом-ректификатом и перемешивали. 1,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, перемешивали и доводили этанолом-ректификатом до метки. Раствор использовали свежеприготовленным.

Для приготовления испытуемого раствора в мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 10 мг (точная навеска) исследуемого образца и растворяли в этаноле-ректификате, объем раствора доводили тем же растворителем до метки и перемешивали. Раствор использовали свежеприготовленным.

Хроматографические условия:

Температура инжектора – 175 °С.

Температура детектора – 250 °С.

Газ-носитель – азот.

Поток газа-носителя – 30 мл/мин.

Поток водорода – 30 мл/мин.

Поток воздуха – 300 мл/мин.

Объем вводимой пробы – 1 мкл.

Перед испытанием проводили тестирование пригодности хроматографической системы. В хроматограф вводили стандартный раствор 5 раз и записывали хроматограммы. Хроматографическая система считается пригодной для анализа при выполнении следующих условий:

- 1) для пика *n*-гексана относительное стандартное отклонение должно быть не более 15%;
- 2) коэффициент асимметрии должен быть не более 3;
- 3) эффективность колонки по пику *n*-гексана не менее 5000 теоретических тарелок.

Для определения содержания *n*-гексана в анализируемом образце в колонку хроматографа последовательно вводили стандартный раствор и испытуемый раствор по 5 раз каждый.

Типичная хроматограмма испытуемого раствора представлена на рисунке 6.

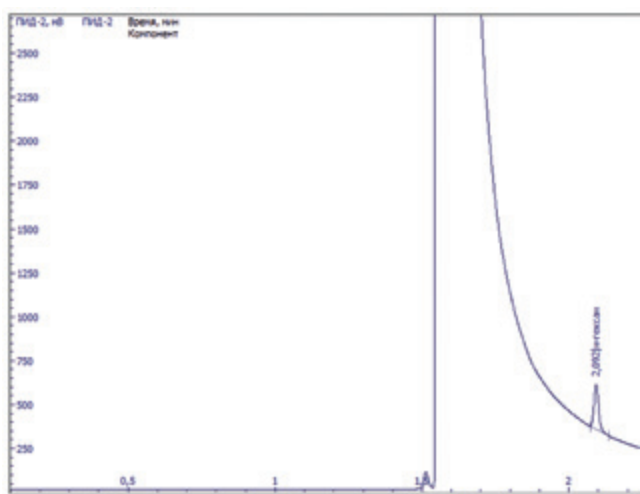


Рисунок 6. Типичная хроматограмма катионного производного БПИ, полученная в ходе анализа остаточного содержания *n*-гексана методом ГЖХ

Содержание *n*-гексана в исследуемом образце (X) в процентах рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot 100 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a_1 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100} = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot P}{S_0 \cdot a_1 \cdot 10000},$$

где S_1 – площадь пика *n*-гексана на хроматограмме испытуемого раствора; S_0 – площадь пика *n*-гексана на хроматограмме стандартного раствора; V – объем *n*-гексана, взятый для приготовления стандартного раствора, a_1 – субстанции испытуемого образца, г; a_0 – навеска стандартного образца, мг; P – содержание *n*-гексана в стандартном образце, %.

Эмпирическим путём на данном этапе исследования было установлено, что содержание *n*-гексана в ФС должно быть не более 0,029% (290 ppm).

ФС катионного производного БПИ в дальнейшем планируется использовать для создания парентеральной стерильной лекарственной формы, поэтому необходимо провести анализ на микробиологическую чистоту и содержание бактериальных эндотоксинов.

Микробиологическая чистота катионного производного БПИ как фармацевтической субстанции долж-

на соответствовать требованиям категории 1.2. Б согласно ОФС.1.2.4.0002.15. Для проведения анализа на содержание бактериальных эндотоксинов готовили исходный раствор ФС в диметилсульфоксиде с концентрацией 1 мг действующего вещества на 0,5 мл, а затем разводили его не менее чем в 20 раз (ГФ XIII, Т. 1, С. 956). Предельное содержание бактериальных эндотоксинов в субстанции должно составлять не более 5 ЕЭ/мг.

Ещё одним важнейшим параметром, необходимым для стандартизации катионного производного БПИ в качестве ФС, является его количественное определение. На основании данного показателя можно установить содержание катионного производного БПИ в испытуемом образце. Это не только помогает зарегистрировать чистоту и соответствие анализируемого вещества стандартному, но и позволит в дальнейшем при использовании стандартизуемой ФС для создания лекарственной формы нормировать дозировку препарата.

Для количественного определения стандартизуемого образца благодаря доступности, малой трудоёмкости и возможности применения для качественного анализа был выбран метод УФ-спектроскопии.

Около 10 мг (точная навеска) анализируемого образца помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяли в 5 мл хлороформа, доводили до метки тем же растворителем и перемешивали. Измеряли оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре СФ-104 фирмы «Аквилон» при максимуме 825 ± 2 нм, при котором проявляется биологическая активность исследуемого соединения при использовании для ФДТ.

Количественное содержание (X) катионного производного бактериопурпуринимиды в анализируемом образце в процентах рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A \cdot V \cdot 100 \cdot (100 - W)}{k \cdot a},$$

где A – оптическая плотность раствора катионного производного БПИ при $\lambda = 825 \pm 2$ нм; k – коэффициент экстинкции, равный 0,9964; V – объём испытуемого раствора, мл; a – масса пробы испытуемого образца, мг.

Испытуемый образец должен содержать не менее 90,0% и не более 110,0% в пересчёте на сухое вещество.

Описываемые показатели позволяют с наибольшей точностью определить соответствие качества ФС на основе катионного производного БПИ установленным стандартам.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Антимикробная ФДТ является достаточно перспективным методом для борьбы с патогенной микрофлорой на основании использования положительно

заряженного производного порфирина – катионного производного бактериопурпуринимида в качестве ФС.

Для того чтобы с наибольшей точностью охарактеризовать катионное производное БПИ как фармацевтическую субстанцию, был исследован ряд параметров, регламентируемых Государственной фармакопеей РФ XIII издания в качестве наиболее значимых и необходимых для стандартизации ФС, которое в дальнейшем планируется использовать для получения парентеральной лекарственной формы.

На основании исследований, проведенных с применением наиболее современных, точных и пригодных для анализа методов, по каждому из испытуемых показателей были получены соответствующие экспериментальные данные, на основании которых был разработан проект спецификации на продукт, представленный в таблице 1.

Полученные данные представляют собой научную и техническую ценность, являясь материалом, не только позволяющим оценить качество получаемого катионного БПИ, но и предоставляющим возможность приступить к дальнейшему получению и изучению лекарственной формы на основе данного соединения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных исследований полученное на основе порфирина химическое соединение, представляющее собой производное бактериохлорофилла *a* – метилового эфира 13³-N-(N-метилникотинил) бактериопурпуринимида, было стандартизовано в качестве фармацевтической субстанции и может в дальнейшем применяться в новых лекарственных формах, в частности для антимикробной ФДТ.

Работа выполнена в рамках гранта президента РФ по государственной поддержке ведущих научных школ РФ (НШ-7946.2016.11).

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея РФ, XIII издание. – М.: ФЭМБ, 2015. 1294 с.
2. А.Т. Солдатенков, Н.М. Колядина, И.В. Шендрок. Основы органической химии лекарственных веществ. – М.: Мир, 2007. 192 с.
3. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. – С.: НИИИХ СГМА, 2002. 586 с.
4. T. Maisch. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment // Mini-reviews in Medicinal Chemistry. 2009. V. 9. P. 947–983.
5. J.M. Lim, Z.S. Yoon, J.-Y. Shin, K.S. Kim, M.-C. Yoon, D. Kim. The photophysical properties of expanded porphyrins: relationships between aromaticity, molecular geometry and non-linear optical properties // Chemical Communications. 2008. V. 3.
6. А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. Микробиология. 3-е изд., испр. – М.: Академия, 2009. 352 с.
7. T. Dai, Y.-Y. Huang, M. Hamblin. Photodynamic therapy for localized infections – state of the art // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2009. V. 6. P. 170–188.

8. М.Г. Страховская, Н.С. Беленикина, В.В. Никитина, С.Ю. Коваленко, И.Б. Коваленко, А.В. Аверьянов, А.Б. Рубин. Перспективный фотосенсибилизатор для антимикробной фотодинамической терапии // Клиническая практика. 2013. № 1. С. 25–30.
9. X. Ragàs, D. Sánchez-García, R. Ruiz-González, T. Dai, M. Agut, R. Hamblin, S. Nonell Cationic. Porphycenes as Potential Photosensitizers for Antimicrobial Photodynamic Therapy // Journal of Medical Chemistry. 2010. V. 53. P. 7796–7803.

Таблица 1.

Проект спецификации на ФС катионное производное БПИ

Показатели	Методы	Нормы
1	2	3
Описание	Визуальный	Кристаллический порошок от бордового до темно-бордового цвета
Растворимость	ГФ XIII	Растворим в хлороформе, этаноле, малорастворим в этилацетате, практически нерастворим в воде
Подлинность	¹ H-ЯМР-спектроскопия	¹ H-ЯМР-спектр 2% раствора субстанции, зарегистрированный в CDCl ₃ , по положению, интегральным интенсивностям, мультиплетности и химическим сдвигам сигналов должен соответствовать прилагаемому спектру (рисунок 1)
	Спектрофотометрия в УФ- и видимой областях	Спектр поглощения 0,01 мг/мл субстанции в хлороформе в области от 190 до 900 нм должен иметь максимумы поглощения при 366±2 нм, 551±2 нм, 825±2 нм (рисунок 2)
Родственные примеси	ВЭЖХ	Метилловый эфир (N'-никотинил)-N-аминобактериопурпуринимида – не более 0,5%. Неидентифицированные примеси – не более 2%
Сульфатная зола	ГФ XIII	Не более 0,1%
Тяжелые металлы	ГФ XIII	Не более 0,001%
Потеря в массе при высушивании	ГФ XIII	Не более 5,0%
Остаточные органические растворители	ГЖХ	Пиридин – не более 0,02%. Хлороформ – не более 0,006%. N-гексан – не более 0,029%
Микробиологическая чистота	ГФ XIII	Категория 1.2 Б
Бактериальные эндотоксины	ГФ XIII	Не более 5 ЕЭ/мг
Количественное определение	Спектрофотометрия в УФ- и видимой областях	Не менее 90,0% и не более 110,0% в пересчете на сухое вещество
Упаковка	По 100 мг во флаконе из темного стекла	
Маркировка	В соответствии с нормативной документацией (НД)	
Хранение	В сухом темном месте при температуре от 2 до 8 °С	
Срок годности	1 год	