

11. US Patent N 8163750. C07D 498/02. Fluorene derivatives, compositions containing the same and use thereof as inhibitors of the protein chaperone HSP 90 [Electronic resource] / F. Thompson, P. Mailliet, J.-M. Ruxer, H. Goulaouic, F. Vallee, H. Minoux, F. Pilorge, L. Bertin, S. Hourcade (FR), M. Mendez-Perez, P. Hamley (DE); Sanofi-Aventis (FR). – № 12/625005; Filed. 24.11.2009; Publ. 24.04.2012. – 143 p.
12. US Patent N 8178668. C07D 401/14. 2-Aminopyridine kinase inhibitors [Electronic resource] / A.G. Steinig, M.J. Mulvihill, J. Wang, D.S. Werner, Q. Weng (NY), H.Coate (CA), X. Chen (NY); OSI Pharmaceuticals, LLC (NY). – № 12/365325; Filed. 04.02.2009; Publ. 15.05.2012. – 157 p.
13. US Patent N 8288425. A61K 31/4184. Benzimidazoles / M.L. Edwards, P.J. Cox, S. Amendola (NJ), S.D. Deprets (FR), T.A. Gillespy (NJ), C.D. Edlin, A.D. Morley (GB), C.J. Gardner, B. Pedgrift (NJ), H. Bouchard, D. Babin, L. Gauzy, A. Le-Brun (FR), T.N. Majid (NJ), J.C. Reader, L.J. Payne, N.M. Khan, M. Cherry (GB); Aventis Pharmaceuticals Inc. (NJ). – № 11/029064; Filed. 04.01.2005; Publ. 16.10.2012. – 160 p.
14. Химиотерапия злокачественных опухолей / Под. ред Н.Н. Блохина. – М.: Медицина, 1977. — 320 с.
15. Машковскій М.Д. Лекарственные средства: в 2 т. Т. 2. 14-е изд. / М.Д. Машковский. – М.: ООО Издательство Новая волна, 2002 – С. 423 – 424.
16. Pharmaceutical Manufacturing Encyclopedia: comp 4 vol. Vol. 2. 3-rd ed. – NY.: William Andrew Publising, 2007 – P. 1639.
17. Naus P. Cytostatic and Antiviral 6-Arylpyrine Ribonucleosides. IX. Synthesis and evaluation of 6-Substituted 3-Deazapurine Ribonucleosides / P. Naus, M. Kuchar, M. Hock // Collect. Czech. Chem. Commun. – 2008. – Vol. 73, № 5. – P. 665–668.
18. Миникер Т.Д. Аза- и дезааналоги пуриновых нуклеозидов / Т.Д. Миникер, М.Н. Преображенская // Химия гетероцикл. соединений. – 1981. – № 2. – С. 147 – 161.
19. Studies of the Chemical Synthesis of Potential Antimetabolites. 30. Regioselective Introduction of a Chlorine Atom into the Imidazo[4,5-*b*]pyridines Nucleus [Text] / T. Itoh, K.Ono, T. Sugawara [et al.] // J. Het. Chem. – 1982. – Vol. 19. – P. 513 – 517.
20. Jain P.C. Potential Purine Antagonists: Part IV – Synthesis of N- β -D-Ribofuranosides of Substituted Imidazo(*b*)- & Imidazo(*c*)pyridines / P.C. Jain, S.K. Chatterjee, N. Anand // Indian J. Chem. – 1963. – Vol. 1, № 1. – P. 30 – 35.
21. Itoh T. Synthetic Studies of Potential Antimetabolites. XIII. Synthesis of 7-Amino-3- β -D-Ribofuranosyl-3H-imidazo[4,5-*b*]pyridines (1-Deazaadenosine) and Related Nucleosides [Text] / T. Itoh, S. Kitano, Y. Mizuno // J. Het. Chem. – 1972. – Vol. 9. – P. 465 – 470.
22. Синтез и дегидрирование 4-гетарилпроизводных спинацеамина и спинацина / Н.Н. Смоляр, М.Г. Абрамянц, Т.И. Завязкина [и др.] // Журн. орган. химии. – 2009. – Т. 45, вып. 8. – С. 1228 – 1231.

Поступило до редакції 26.12.2012 р.

**Я. Г. Бальон, О. В. Сімуров, Л. І. Вакулєнко, Л. М. Точілка, Л. А. Кузмінська
ДУ “Інститут ендокринології та обміну речовин
ім. В. П. Комісарєнка НАМН України”, м. Київ**

УДК 612.45:615.45

СТВОРЕННЯ РОЗЧИНУ ДЛЯ ІН’ЄКЦІЙ ІНГІБІТОРА ФУНКЦІЇ НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ *o,n'*-ДДД (ХЛОДИТАНУ) І АНАЛІТИЧНО- НОРМАТИВНОЇ ДОКУМЕНТАЦІЇ НА ПРЕПАРАТ

Вперше створено розчинну лікарську форму інгібітора функції кори надниркових залоз (КНЗ) - *o,n'*-ДДД (хлодитану) для внутрішньосудинного введення при лікуванні хвороби Іценка-Кушинга та злоякісних пухлин КНЗ. Дані захворювання КНЗ належать до хвороб, які безпосередньо загрожують життю хворого. Тяжкість стану хворого пов’язана як з загальною онкологічною симптоматикою, так із гормональною гіперфункцією, яка може самостійно бути причиною смерті. Тому актуальною залишається проблема лікування зазначених форм патології як з метою усунення гіперфункції гормонів, так і для позбавлення хворого від пухлини та її метастазів. Доведено клінічну ефективність застосування інгібіторів функції КНЗ, які спричиняють на неї цитотоксичний вплив [1, 2]. Найбільша адренкортиколітична активність на сьогодні виявлена у *орто, пара'*-дихлородифенілдіхлоретану (*o,n'*-ДДД, хлодитан, мітотан, лізодрен), який застосовують у вигляді таблеток [3]. Розроблено комбінований медикаментозно-хірургічний метод лікування даних захворювань із використанням адреналектомії і хлодитану [4, 5]. Для досягнення стійкого клінічного ефекту необхідно застосовувати хлодитан перорально впродовж декількох місяців (максимальна добова доза 8-10 г), причому курси лікування необхідно повторювати. Ефект лікування даним препаратом залежить від індивідуальної реактивності хворого, а також від морфологічного і функціонального стану КНЗ. У деяких хворих може розвиватись резистентність до хлодитану, в цих випадках без операції не обійтись. Але в більш як 90% випадків застосування препарату приводить до нормалізації функції КНЗ.

При пероральному використанні високих доз хлодитану спостерігаються деякі побічні ускладнення – нудота, блювання, свербіння шкіри, діарея, атаксія, лейкопенія, гінекомастія та ін. [6, 7]. Крім того, слід зазначити, що хлодитан завдяки ліпофільності при пероральному застосуванні має невисоку біодоступність. З метою підвищення терапевтичної ефективності хлодитану, зниження його дозування та зменшення побічної дії запропонована розчинна лікарська форма препарату для внутрішньовенного введення, яка не має світових аналогів [8].

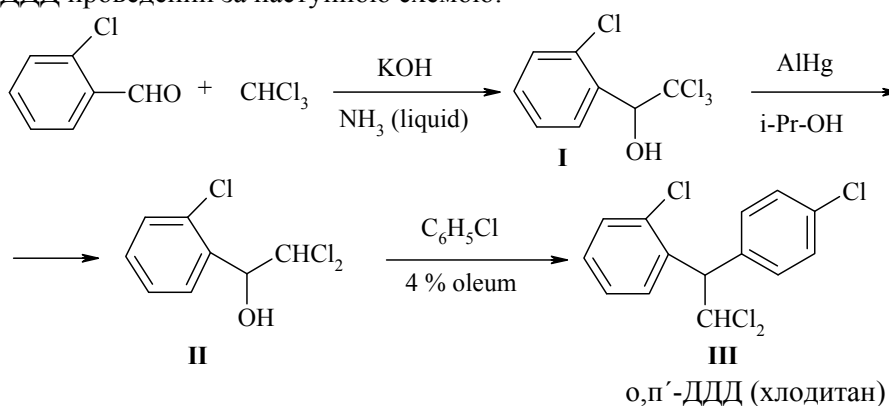
Слід зазначити, що за параметрами гострої токсичності розчин *o,n'*-ДДД для ін'єкцій є малотоксичним [9], він виявляє активність інгібітора функції КНЗ як у культурі КНЗ людини (*in vitro*), так і у собак при внутрішньовенному введенні (*in vivo*), що є визначальним для подальших клінічних досліджень даної форми препарату [10].

Важливим етапом подальших досліджень було експериментальне визначення основних хіміко-фармацевтичних показників, які є необхідними для створення аналітичної нормативної документації на розчин для ін'єкцій 50 мг/мл згідно вимог Державної фармакопеї України (ДФУ) [11].

Експериментальна частина

Спектри ЯМР ^1H виміряні на спектрофотометрі Varian VXR-300 (300 МГц, внутрішній стандарт ТМС). УФ спектри записані на спектрофотометрі Shimadzu UV-3100 в суміші розчинників. Кількісне визначення *o,n'*-ДДД в розчині проводилось на газовому хроматографі "Хром-5".

Синтез *o,n'*-ДДД проведений за наступною схемою:



1-*o*-Хлорфеніл-2,2,2-трихлоретанол (I). До суміші 336 г порошкоподібного калій гідроксиду в 3 л рідкого аміаку при -75°C поступово додають розчин 140.5 г *o*-хлоробензальдегіду в 500 мл хлороформу з такою швидкістю, щоб температура не піднімалась вище -65°C . Реакційну суміш перемішують впродовж 30 хв. і потім невеликими порціями додають 320 г твердого амоній хлориду, при цьому слідкують щоб температура не піднімалась вище -60°C . Реакційну суміш перемішують впродовж 1 год., припиняють охолодження і, після того, як аміак випарується, залишок виливають у воду (1 л). Органічний шар відділяють, а водний екстрагують хлороформом (3×100 мл). Хлороформні витяжки і органічний шар об'єднують, промивають водою до нейтральної реакції і сушать сульфатом натрію. Хлороформ відганяють, залишок кристалізують із гексану. Вихід 242 г (93%). $T_{\text{топл.}}$ 47°C . Знайдено, %: Cl 54.57. $\text{C}_8\text{H}_6\text{Cl}_4\text{O}$. Обчислено, %: Cl 54.61.

1-*o*-Хлорофеніл-2,2-дихлоретанол (II). Суміш 130 г сполуки (I) і 65 г амальгами алюмінію в 1250 мл 90% етилового або ізопропілового спирту кип'ятять зі зворотним холодильником до тих пір, поки не розчиниться амальгама (10-12 год.). Напіврідку масу піддають центрифугуванню. Спиртовий розчин сполуки (II) зливають, а до залишкової маси додають воду і екстрагують хлороформом (4×100 мл). Хлороформний розчин сушать сульфатом натрію. Відганяють спирт і хлороформ, а в залишку одержують продукт (II). Вихід 107 г (96%), безбарвна рідина, $T_{\text{кип.}}$ 125°C (3 мм рт. ст.); d_4^{20} 1.4412; n_D^{20} 1.5730; M_{R_D} знайдено 51.57, обчислено 51.65. Знайдено, %: Cl 47.04. $\text{C}_8\text{H}_6\text{Cl}_2\text{O}$. Обчислено, %: Cl 47.09.

1-*o*-Хлорофеніл-1-*n'*-хлорофеніл-2,2-дихлоретан (*o,n'*-ДДД) (III). До суміші 113 г сполуки (II) і 79 г хлоробензолу при 30°C і енергійному перемішуванні по краплях додають 235 мл 4% олеуму. Після закінчення додавання олеуму реакційну суміш перемішують впродовж 6 год. при $30-35^\circ\text{C}$, потім охолоджують, а утворений осад відфільтровують і кристалізують з гексану. Вихід 114 г (65 %). $T_{\text{топл.}}$ $75-76^\circ\text{C}$ (відповідає літературним даним [3]).

УФ спектр: 0.02% розчин препарату в 95% етиловому спирті в області від 220 до 350 нм має максимуми поглинання при 261 ± 1 , 265 ± 1 та 275 ± 1 нм.

Спектр ЯМР ^1H , ДМСО d_6 , δ м.ч.: 7.88-7.33 м (8H, 2 Ar); 7.24 д (H, CHCl_2); 5.07-5.04 д (H, CH).

Як об'єкт дослідження був обраний 5% розчин *o,n'*-ДДД (хлодитану) в суміші розчинників – пропіленгліколь : спирт етиловий : N,N-диметилацетамід, 7:2:1. Дані розчинники і співвідношення застосовуються для створення лікарських препаратів [12]. Специфікація на 5% розчин для ін'єкцій *o,n'*-

ДДД (хлодитану) починається з опису: органолептично встановлено, що даний розчин є прозорою безбарвною рідиною зі слабким специфічним запахом. Важливим показником розчину діючої субстанції є його ідентифікація, для якої запропоновано ультрафіолетовий спектр 0,02% розчину в області від 220 до 350 нм, що має максимуми поглинання при 261 ± 1 нм, 268 ± 1 нм та 275 ± 1 нм. Якісною реакцією для розчину є характерна реакція на хлориди. Для цього сухий залишок (~0.1 г) після випаровування 5 мл суміші розчинників спікають із сумішшю для спікання [13] (2.5 г безводного натрій карбонату розтирають з 4.5 г безводного калій карбонату і 2.5 г калій нітриту). Одержаний сплав розчиняють в 10 мл води, фільтрують. Фільтрат дає характерну реакцію на хлориди (ДФУ, 2.3.1, С. 73).

Розчин має бути прозорим (ДФУ, 2.2.1, С. 15) і безбарвним, або забарвлення не інтенсивніше за еталон ВУ₇ (ДФУ, 2.2.2, С. 15).

Розчин випробують на наявність механічних включень. Візуально оцінюють наявність рухомих нерозчинних часток у розчині за допомогою спеціального обладнання (ДФУ, 2.9.20, С. 166). Наявності механічних включень у ін'єкційному розчині *o,n'*-ДДД (хлодитану) не виявлено.

Випробування на "супровідні домішки" проводять методом тонкошарової хроматографії (ДФУ, 2.2.27, С. 41), використовуючи хроматографічні пластинки Silicagel 60 фірми "Merck" (Німеччина) на алюмінієвій основі розміром 10×15 см і товщиною шару 0.20 мм.

Випробуваний розчин. Ін'єкційний розчин (8 мл) препарату випарюють при 100-105°C і 2 мм. рт. ст. до сухою залишку і охолоджують. До залишку додають 5 мл ацетону, ретельно перемішують впродовж 2 хв. скляною паличкою до повного розчинення осаду. Готують розчини порівняння.

Розчин порівняння (а). 0.2 г *n,n'*-ДДД розчиняють в ацетоні і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Розчин порівняння (б). 0.5 мл розчину порівняння (а) доводять ацетоном до об'єму 10 мл і перемішують.

Розчин порівняння (в). 5 мл розчину порівняння (б) доводять ацетоном до об'єму 10 мл і перемішують.

Розчини використовують свіжоприготовленими.

На лінію старту хроматографічної пластини наносять 50 мкл (4000 мкг *o,n'*-ДДД) випробуваного розчину, 10 мкл (10 мкг *n,n'*-ДДД) розчину порівняння (б) і 10 мкл (5 мкг *n,n'*-ДДД) розчину порівняння (в). Пластину сушать на повітрі до зникнення запаху ацетону, поміщають в камеру з сумішшю розчинників етилацетат – гексан, 5:95 і хроматографують методом вертикального елюювання. Коли фронт розчинників пройде 10 см від лінії старту, пластину виймають із камери, сушать у струмені теплого повітря і переглядають в УФ-світлі з довжиною хвилі 254 нм.

На всіх хроматограмах на одному рівні присутні тільки плями випробуваного розчину і відповідні за розміром плями розчинів порівняння, що свідчить про відсутність супровідних домішок і відповідність зразків вимогам ДФУ (2.2.27, С. 41).

Результат аналізу вважають вірогідним, якщо на хроматограмі чітко видно пляму розчину порівняння (в).

Об'єм, що витягується, має витримувати вимоги ДФУ (2.9.17, С. 164) – в контейнері повинно міститися не менш ніж 10.5 мл розчину.

Для одержання стерильного розчину була запропонована стерилізація у паровому стерилізаторі при 121°C впродовж 15 хв. Перевірка придатності даного методу проводилась в лабораторії мікробіологічного контролю ВАТ "Фармак". Випробування проводилось в асептичних умовах (зона А, клас В) згідно вимог ДФУ розділ 2.6.1. Для дослідження були використані ламінарна шафа HSP 18 "Негаеус", стеритест-компакт "Millipore", інкубатори UB 12, BK 6160, "Kendro", фільтруючі системи стеритест TZHV LA 210 "Millipore". Як живильні середовища застосовувались: тіогліколове (Thio), соєво-казеїновий бульйон (TSB), розчин 1 г/л пептону казеїнового, соєво-казеїновий агар (TSA), розчин 9 г/л натрію хлориду, колумбійський агар. Посів на живильні середовища проводили методом мембранної фільтрації з використанням стерильних одноразових систем TZHV LA 210. Вміст 20 флаконів розчину для ін'єкцій 50 мг/мл по 10 мл кожний (200 мл) пропускали через 2 стерильних мембранних фільтри, попередньо зволжених стерильним розчином 1 г/л пептону казеїнового. Після закінчення фільтрації кожний мембранний фільтр відмивали п'ятьма порціями по 100 мл стерильного розчину 1 г/л пептону казеїнового.

Для перевірки придатності методики випробування в останню порцію промивної рідини об'ємом 200 мл вносили 2 мл суспензії відповідного штаму мікроорганізмів (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Clostridium sporogenes* ATCC 9404, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 16404) з концентрацією не більше 100 КУО/мл, струшували для рівномірного розподілу клітин і фільтрували крізь два мембранні фільтри стеритесту.

Після закінчення фільтрації каністри стеритесту заповнювали тіогліколевим середовищем або середовищем з соєво-казеїновим бульйоном відповідно до внесених тест-штамів мікроорганізмів, рекомендованих для кожного живильного середовища.

Для контролю експерименту крізь два мембранних фільтри стеритесту фільтрували таку ж кількість розчину 1 г/л пептону казеїнового з такою ж концентрацією відповідних тест-штамів мікроорганізмів та заповнювали живильними середовищами (позитивний контроль).

Усі посіви інкубували одночасно при відповідних температурах згідно вимог ДФУ: посіви в тіогліколевому середовищі при 30-35°C; посіви в соєво-казеїновому середовищі при 20-25°C. Тривалість інкубації становила не більше 5 діб для всіх посівів. Придатність методики визначали при порівняльній оцінці інтенсивності росту тест-культур у випробуваннях з препаратом та без нього.

Оцінка біологічної чистоти препарату проводилась за кількістю бактеріальних ендотоксинів, значення вмісту яких подається в міжнародних одиницях (МО) і аналізується методом “Телеутворення: граничне випробування” згідно вимог ДФУ (2.6.14, С. 127 метод А-В). У дослідях використовувались реактиви та стандарти фірми “Assoc / of Cape Cod Incorp”, лізат амебоцитів (Pyrotell) з чутливістю 0.03 ЕО/мл розведений на буфері 0.2 М трис(гідроксиметиламінометан)гідрохлориду. Виявлено, що дослідні зразки 5% розчину для ін’єкцій *o,n'*-ДДД (хлодитану) у максимально допустимому розведенні не містить факторів, які здатні впливати на кінетику взаємодії гідролізату амебоцитів та ліпополісахаридного компоненту ендотоксинів. Крім того, було встановлено, що фактичний вміст ендотоксинів у аналізованих зразках препарату був значно нижчий від граничної концентрації, обчисленої теоретично (3.5 МО/мл). На підставі проведених досліджень розділ “бактеріальні ендотоксини” згідно вимог ДФУ [11] (2.6.14, с.127) подано в такій редакції - Гранична концентрація ендотоксинів не має перевищувати 3.5 МО/мл.

Аномальна токсичність визначалась згідно вимог ДФУ (2.6.9, с. 109). Кожній з 5 здорових мишей внутрішньочеревно вводять по 1 мл ін’єкційного розчину *o,n'*-ДДД, а контрольній групі – по 1 мл стерильного фізіологічного розчину. За станом тварин спостерігають сім діб. За цей час всі миші залишилися живими і у них не спостерігалось ознак зміни рухливості, споживання їжі та води. Це свідчить, що даний розчин є нетоксичним і тест-доза при аномальній токсичності складає 50 мг *o,n'*-ДДД в 1 мл на 1 мишу.

Кількісне визначення діючої субстанції в розчині проводилось згідно вимог ДФУ (5.3.1, С. 67) методом газової хроматографії на хроматографі “Хром-5” (Чехія) з полум’яно-іонізаційним детектором за таких умов: колонка з нержавіючої сталі довжиною 1.5 м і діаметром 3 мм, нерухома фаза – 5% SE-30 на хроматоні N-AW, зернистість 0.125-0.160 мм, газ-носіє – гелій, швидкість газу-носія 50 мл/хв, температура термостата – 190°C, температура випаровувача – 270°C, об’єм проби – 10 мкл, розчин порівняння – 5 % розчин *n,n'*-ДДД.

Для приготування розчину порівняння спочатку готують суміш розчинників – 70% пропіленгліколю, 20% етанолу і 10% N,N-диметилацетаміду. Далі в мірну колбу на 100 мл поміщають (5±0,01) г *n,n'*-ДДД (стандарт), додають 50 мл суміші розчинників, енергійно струшують до повного розчинення і доводять об’єм до мітки.

Поперемінно хроматографують 1 мкл випробуваного розчину і 1 мкл розчину порівняння не менш, ніж 5 разів. Сумарний сигнал розчинників, який з’являється на початку хроматографування до уваги не береться, а площі всіх отриманих піків сумують і знаходять їх середню величину – $S_{ст}$ і S_x . За отриманими даними визначають вміст *o,n'*-ДДД в 1 мл розчину за формулою:

$$m_x = S_x * m_{ст} / S_{ст},$$

де S_x – середнє значення площі піків досліджуваного зразка, $S_{ст}$ – середнє значення площі піків стандарту, $m_{ст}$ – маса (г) наважки стандарту в 1 мл розчину, m_x – маса (г) діючої субстанції в 1 мл розчину.

Відносне стандартне відхилення площі піків *o,n'*-ДДД не повинне перевищувати 2%. Вміст *o,n'*-ДДД в 1 мл розчину повинен бути від 0.049 до 0.051 г.

П’ять контейнерів розчину для ін’єкцій 50 мг/мл по 10 мл кожний зберігались в холодильнику і п’ять – при 15–25°C. При зберіганні в холодильнику в двох контейнерах діюча субстанція випала в осад, тому розділ зберігання подано в такій редакції – в захищеному від сонця місці при 15–25°C.

Стерильний 5% розчин *o,n'*-ДДД був закладений на початку 2009 р для визначення його терміну придатності. При закладанні розчин був прозорий, безбарвний без механічних включень. Через кожні три місяці зберігання проводилось візуальне обстеження зразків (прозорість, кольоровість), проводилось дослідження на наявність механічних включень, супровідних домішок, стерильність, кількісне визначення діючої субстанції в розчині, ідентичність розчину підтверджувалась якісною реакцією на хлориди та УФ-спектроскопією. Впродовж 3 років зберігання жодних змін з розчином не було зафіксовано. Визначення терміну придатності ін’єкційного розчину *o,n'*-ДДД триває.

Виклад і обговорення результатів

Для ідентифікації розчину була запропонована характерна реакція на хлориди із застосуванням суміші для спікання, яка наведена в фармакопеї РФ [13], на жаль, вона відсутня в ДФУ, хоча її наявність очевидна. Теоретично при стерилізації розчину у паровому стерилізаторі при 121°C можуть утворюватися естерні сполуки або продукт дегідрохлорування – 1-(*o*-хлорофеніл)-1-(*n*-хлорофеніл)-2-хлоретилен. Комплексними дослідженнями (УФ-спектроскопія, мас-спектрометрія, тонкошарова і газова хроматографія) було доведено, що розчин у цих умовах не зазнає ніяких змін. Проводилась перевірка даного способу стерилізації методом мембранної фільтрації, результати проведених досліджень наведені в табл. 1-3.

Таблиця 1

Визначення концентрації інокуляту

Назва тест-штамів мікроорганізмів	Середовище	К-сть КУО на кожній з 2 чашок	Концентрація інокуляту (середнє з 2 ч.)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	TSA	37 ; 44	42
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	TSA	62 ; 63	63
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 19404	Колумб. аг.	60 ; 75	72
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	TSA	20 ; 29	25
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	TSA	85 ; 79	82
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	TSA	30 ; 34	32

Таблиця 2

Визначення кількості мікрорганізмів в суспензії для інокуляції

Назва тест-штамів мікроорганізмів	Середовище	Темпер. інкуб., °C	Облік результатів	
			К-сть КУО на кожній з 2 чашок	Посівна доза
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	TSA	32,5	37 ; 44	42
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ACC 9027	TSA	32,5	62 ; 63	63
<i>Clstridium sporogenes</i> ATCC 19404	Колумб. аг.	32,5	60 ; 75	72
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	TSA	32,5	20 ; 29	25
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	TSA	22,5	85 ; 79	82
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	TSA	22,5	30 ; 34	32

Таблиця 3

Результати перевірки придатності методики випробування на стерильність

Назва тест-штамів мікроорганізмів	Середовище	Наявність та інтенсивність росту тест-культур (р), +		
		Темпер. інкуб., °C	З препаратом. Відмивання порціями 5 по 100 мл	Без препарату (позитивний контроль)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Thio	32,5	P +++	P +++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Thio	32,5	P +++	P +++
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 19404	Thio	32,5	P +++	P +++
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	TSB	32,5	н/р*	P +++
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	TSB	22,5	н/р*	P +++
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	TSB	22,5	P +++	P +++

*Відповідно до вимог ДФУ 2.6.1 загальний об'єм промивної рідини не повинен перевищувати 5 порцій по 200 мл.

Слід відзначити, що препарат в умовах проведення випробування проявив антимікробну дію, яка для тест-штамів *Candida albicans* ATCC 10231 та *Bacillus subtilis* ATCC 6633 не була нейтралізована промиванням фільтру п'ятьма порціями по 100 мл стерильного розчину 1 г/л пептону казеїнового. Відповідно до вимог ДФУ [11] розділ 2.6.1 загальний об'єм промивної рідини не повинен перевищувати п'яти порцій по 200 мл, навіть у тому разі, коли при перевірці придатності методики встановлено, що такий режим відмивання мембранних фільтрів не дозволяє повністю усунути антимікробну активність лікарського засобу. Всі живильні середовища і рідини були перевірені на стерильність і наявність ростових властивостей, а в тест-штамах мікроорганізмів визначена концентрація інокуляту (табл. 1).

Кількість мікроорганізмів в суспензії для інокуляції приведено в табл. 2. Результати перевірки методики випробування на стерильність приведені в табл. 3. Слід відмітити, що протягом 14 діб як в тіогліколевому середовищі, так і середовищі соєво-козеїнового бульйону спостерігалась відсутність бактеріостатичної та фунгістатичної дії препарату. Інтенсивність росту мікроорганізмів в присутності та відсутності препарату була однаковою.

ОРГАНІЧНА ХІМІЯ

На основі проведених хіміко-фармацевтичних досліджень створена аналітична нормативна документація на *o,n'*-ДДД – розчин для ін'єкцій 50 мг/мл із наступною специфікацією:

Пункти	Назва показника	Допустимі межі	Методи контролю
1	Опис	Прозора безбарвна рідина зі слабким специфічним запахом.	За п.1 ДФУ* органолептично
2	Ідентифікація	УФ спектр 0,02 % розчину в області від 220 до 350 нм має максимуми поглинання при 261±1 нм, 268±1 нм, 275±1 нм. 5 мл розчину препарату випарюють до утворення сухого залишку. 0,1 г одержаної маси сплавляють з 0,5 г суміші для спікання (2,5 г безводного натрій карбонату розтертого з 4,5 г безводного калій карбонату і 2,5 г калій нітриту). Отриманий плав дає характерну реакцію на хлориди.	За п.2, ДФУ* 2.2.25 За п.2, ДФУ* 2.3.1
3	Прозорість	Має бути прозорим	За п.3, ДФУ* 2.2.1
4	Кольоровість	Має бути безбарвним або забарвлення не інтенсивніше за еталон ВУ ₇ .	За п.4, ДФУ* 2.2.2, метод II
5	Механічні включення	Має відповідати вимогам.	За п.5, ДФУ* 2.9.20
6	Супровідні домішки	На хроматограмі випробуваного розчину спостерігається пляма, що розміщена на рівні плями розчину порівняння.	За п.6, ДФУ* 2.2.27 (метод ТШХ)
7	Об'єм, що витягується	Має відповідати вимогам	За п.7, ДФУ* 2.9.17
8	Стерильність	Препарат повинен бути стерильним	За п.8, ДФУ* 2.6.1
9	Бактеріальні ендотоксини	Гранична концентрація ендотоксинів становить 3,5 МО на 1 мл	За п.9, ДФУ* 2.6.14, метод А
10	Аномальна токсичність	Тест-доза: 50 мг <i>o,n'</i> -ДДД в 1 мл на 1 мишу	За п.10, ДФУ* 2.6.9
11	Кількісне визначення <i>o,p'</i> -ДДД	Від 0,049 до 0,051 г в мл препарату	За п.11 (метод газової хроматографії)
12	Зберігання	В щільно закупореному контейнері, в захищеному від світла місці при температурі від 15 до 25 °С	

* - діюче видання

РЕЗЮМЕ

Створено розчин для ін'єкцій 50 мг/мл інгібітора функції надниркових залоз *o,n'*-ДДД (хлодитану), досліджені його хіміко-фармацевтичні властивості згідно вимог Державної фармакопеї України, на основі яких створено аналітичну нормативну документацію на препарат.

РЕЗЮМЕ

Создан раствор для инъекций 50 мг/мл ингибитора функции надпочечных желез *o,n'*-ДДД (хлодитана), исследованы его химико-фармацевтические свойства согласно требований Государственной фармакопеи Украины, на их основе создано аналитическую нормативную документацию на препарат.

SUMMARY

Created by injection of 50 mg/ml of inhibitor function of the adrenal glands *o,p*-DDD (chloditan), studied its chemical and pharmaceutical properties in accordance with the requirements of State Pharmacopoeia of Ukraine, on the basis of established analytical normative documentation in preparation.

ЛІТЕРАТУРА

1. Комиссаренко В. П. Ингибиторы функции надпочечных желез / В. П. Комиссаренко, А. Г. Резников. – Киев: Здоров'я, 1972. – 374 с.
2. Інгібітори гормонування в надниркових залозах та їх застосування у клінічній практиці / М. Д. Тронько, І. В. Комісаренко, Я. Г. Бальон [та ін.] // Журн. АМН України. – 2010. – Т. 16, № 2. – С. 271–287.
3. Хлодитан / В. П. Комиссаренко, А. Г. Резников, И. В. Комиссаренко, Я. Г. Бальон // Хим.-фарм. журнал. – 1977. – Т. 11, № 9. – С. 146–149.
4. Кваченюк А. М. Хлодитанотерапія адренокартиального раку / А. М. Кваченюк // Лікарська справа. – 2004. – № 8. – С. 64–67.
5. Комиссаренко И. В. Фармакотерапия опухолей коркового вещества надпочечных желез / И. В. Комиссаренко, С. И. Рыбаков // Фармакол. вісник. – 2000. – № 1. – С. 50–53.
6. Бальон Я. Г. Деякі досягнення у створення лікарських засобів для лікування ендокринної патології / Я. Г. Бальон, В. В. Корпачев // Ендокринологія. – 1996. – Т.1, № 1. – С. 25–31.

7. Машковский М. Д. Лекарственные средства (хлодитан) / М. Д. Машковский. – Москва: ООО Новая волна, 2005. – 1200 с.
8. Спосіб одержання ін'єкційного розчину 1-(*орто*-феніл)-1-(*пара*-феніл)-2,2-дихлоретану (хлодитану), який є інгібітором функції кори надниркових залоз / Я. Г. Бальон, А. Г. Резников, М. Д. Тронько [та ін.] // Пат. України на винахід. – № 94543; Опубл. 10.05.2011, Бюл. № 9.
9. Бальон Я. Г. Дослідження гострої токсичності парентеральної форми о,п'-ДДД (хлодитану) / Я. Г. Бальон, В. В. Ховака, О. В. Сімуров // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2010. – № 3 (16). – С. 12–16.
10. Інгібіція адренкортикальної функції розчином о,п'-ДДД (хлодитану) в досліджах *in vitro* та *in vivo* / Я. Г. Бальон, О. Г. Резников, М. Д. Тронько [та ін.] // ДАН України. – 2011. – № 11. – С. 154–159.
11. Державна фармакопея України. 1-е видання. – Харків: РИРЕГ, 2001. – 556 с.
12. Технология и стандартизация лекарств / под ред. В. П. Георгиевского. – Харьков: РИРЕГ, 2005. – 779 с.
13. XII Государственная фармакопея Российской Федерации. Часть I. – Москва: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. – 704 с.

Поступило до редакції 02.11.2012 р.

Б. М. Петрушка, В. С. Барановський, Б. Д. Грищук
Тернопільський національний педагогічний університет ім. В. Гнатюка

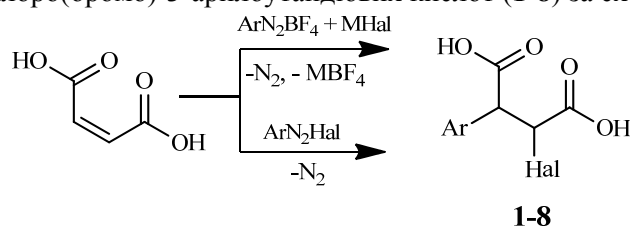
УДК 547.53:311.37

СИНТЕЗ 2-ХЛОРО(БРОМО)-3-АРИЛБУТАНДІОВИХ КИСЛОТ

В реакції аніонарилювання двоосновні ненасичені дикарбонові кислоти практично не досліджені [1, 2]. Нещодавно нами показано, що тетрафлуороборати арилдіазонію реагують з ітаконою кислотою в умовах купрокаталізу з утворенням продуктів хлоро- і тіоціанатоарилювання [3, 4].

З метою розширення синтетичних можливостей реакції аніонарилювання представляло інтерес введення в неї двоосновних ненасичених кислот, в яких кратний карбон-карбоновий зв'язок безпосередньо активований двома карбоксильними групами, зокрема малеїнової кислоти.

Нами встановлено, що тетрафлуороборати арилдіазонію взаємодіють з малеїновою кислотою в присутності хлорид- і бромід-аніонів з виділенням азоту діазогрупи і утворенням продуктів галогеноарилювання – 2-хлоро(бромо)-3-арилбутандіових кислот (**1-8**) за схемою:



Ar = Ph (**1, 5**), 4-MeC₆H₄ (**2, 6**), 4-MeOC₆H₄ (**3, 7**), 4-BrC₆H₄ (**4, 8**);
 Hal = Cl (**1-4**), Br (**5-8**); M = Na, K

Схема 1

Реакції відбуваються при 10–22°C, у присутності каталізатора – купрум (II) тетрафлуороборату. Оптимальне співвідношення реагентів: сіль арилдіазонію – малеїнова кислота – натрій хлорид (калій бромід) – купрум (II) тетрафлуороборат складає 1,1 : 1 : 1,1 : 0,1. Виходи продуктів галогеноарилювання в досліджених умовах становлять 50–59% в розрахунку на малеїнову кислоту.

2-Хлоро(бромо)-3-арилбутандіові кислоти (**1-8**) також одержані з практично такими ж виходами в умовах реакції Меєрвейна взаємодією хлоридів (бромідів) арилдіазонію з малеїновою кислотою (схема 1).

Конкуруючим процесом до реакцій галогеноарилювання малеїнової кислоти є утворення хлоро(бромо)аренів в кількості 10–20% за маршрутом реакції Зандмейєра.

2-Галогено-3-арилбутандіові кислоти (**1-8**) – кристалічні речовини, з температурами плавлення 211–245°C, нерозчинні у воді, добре розчинні у метанолі, етанолі і ацетоні. Виходи, константи і дані елементного аналізу синтезованих сполук (**1-8**) подані в табл. 1.

В знайдених нами умовах реакції аніонарилювання не спостерігається процесів елімінування галогеноводнів та декарбоксілювання однієї COOH-групи, що узгоджується з даними елементного аналізу, ІЧ та мас-спектрів сполук (**1-8**).

Структура синтезованих сполук узгоджується з даними ІЧ та ЯМР ¹H спектроскопії (табл. 2). Зокрема, в ІЧ спектрах сполук (**1-8**) спостерігаються характеристичні смуги поглинання карбонільної (1702–1734 см⁻¹) груп. Спектри ЯМР ¹H містять сигнали протонів ароматичних ядер: мультиплети або дублети в ділянці 7.57–6.90 м.ч. Протони карбоксильних груп резонують в слабкому полі (13.32–12.95 м.ч), а протони метинових груп, зв'язаних з атомом галогену, утворюють дублети при 4.81–4.69 м.ч. з