

ELABORAREA METODELOR FIZICE ȘI CHIMICE NOI DE ANALIZĂ A DIOXOINDOLINONEI – UN POTENȚIAL PRODUS ANTIDEPRESIV AUTOHTON

DOI: 10.5281/zenodo.3631305

CZU: 542.05:615.21

Asistent universitar **Tatiana ȘTEFANET**¹

E-mail: tatiana.stefanet@usmf.md

Doctor în științe chimice, cercetător științific superior **Eugenia STÎNGACI**²

E-mail: flmacaev@gmail.com

Cercetător științific **Oxana VÎSLOUH**³

E-mail: vog_gkm@mail.ru

Doctor habilitat în științe farmaceutice, profesor universitar **Vladimir VALICA**¹

E-mail: vladimir.valica@usmf.md

Doctor habilitat în științe chimice, profesor cercetător **Fliur MACAEV**^{2,3},
laureat al Premiului AȘM 2018 „Nicolae Gărbălău”

E-mail: flmacaev@cc.acad.md

¹Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”²Institutul de Chimie³Centrul Științific al Medicamentului, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
„Nicolae Testemițanu”

ELABORATION OF PHYSICAL AND CHEMICAL NEW METHODS OF DIOXOINDOLINONE ANALYSIS – POTENTIAL AUTOHTON ANTIDEPRESSIVE DRUG

Summary. Mental illnesses are a current public health problem, as their incidence and prevalence are constantly increasing. Depressive disorders are some of the most common psychiatric disorders. According to WHO data, the number of people suffering from depression has increased by 18 percent over the last decade, globally, reaching 322 million. Mental disorder therapy requires continuous updating. In the Laboratory of Organic synthesis and biopharmaceuticals of the Institute of Chemistry was synthesized a new compound, derivative of izatin – Dioxoindolinone – with anxiolytic and antidepressant action (according to preliminary studies).

This article represents the results obtained from the study of the physical, chemical and physico-chemical properties of the studied compound: solubility, aspect of the solution, determination of the limit of non-specific impurities, losses through drying, determination of the melting point, as well as the elaboration of chemical reactions for identification. The results of the following research will be used for the future elaboration of the Analytical Documentation of Normation for Dioxoindolinone.

Keywords: isatin, anxiety, depression, methods of analysis, solubility, aspect of the solution, melting point, losses through drying, non-specific impurities, chemical reactions for identification.

Rezumat. Bolile psihice reprezintă o problemă actuală de sănătate publică, deoarece incidența și prevalența lor sunt în continuă creștere. Tulburările depresive sunt dintre cele mai răspândite afecțiuni psihiatrice. Conform datelor OMS, numărul persoanelor care suferă de depresie a crescut cu 18 la sută în ultimul deceniu, la nivel global, ajungând la 322 de milioane de persoane. Terapia tulburărilor mintale necesită o actualizare continuă. În cadrul Laboratorului de Sinteză organică și biofarmaceutică al Institutului de Chimie a fost sintetizat un nou compus, derivat al izatinei – Dioxoindolinona – cu acțiune anxiolitică și antidepresivă (potrivit studiilor preliminare).

Articolul reflectă rezultatele obținute în urma cercetării unor însușiri fizice, chimice și fizico-chimice ale compusului studiat: solubilitatea, aspectul soluției, determinarea limitei de impurități nespecifice, pierderile prin uscarea, stabilirea punctului de topire, precum și elaborarea reacțiilor chimice de identificare. Rezultatele cercetărilor efectuate vor fi folosite pentru elaborarea ulterioară a Documentației Analitice de Normare pentru Dioxoindolinonă.

Cuvinte-cheie: isatină, anxietate, depresie, metode de analiză, solubilitate, aspectul soluțiilor, punctul de topire, pierderile prin uscarea, impurități nespecifice, reacții chimice de identificare.

INTRODUCERE

Tulburările depresive se numără printre cele mai răspândite afecțiuni psihice [1, 2]. În anul 2000 tulburarea depresivă unipolară se afla printre maladiile principale conform indicilor mondiali DALY, ocupând locul trei (4,3 %) și locul întâi (8,2 %) în țările dezvoltate. Potrivit pronosticurilor, către 2030 această patologie se va afla pe primul loc în lume (6,2%), depășind bolile cardio-vasculare (5,5 %) și traumatismul (4,9 %) [3].

Depresiile rezistente se află printre problemele fundamentale ale psihiatriei actuale, cu numeroase aspecte neclarificate. Actualmente este acceptată ideea că 29-46 % dintre pacienții depresivi sunt nonresponsivi la tratamentul antidepressiv [4].

Cercetarea și tratamentul acestei boli în țările civilizate beneficiază de o finanțare dintre cele mai consistente în domeniul medicinei. Terapia tulburărilor mintale necesită o actualizare continuă.

Există o gamă vastă de preparate cu acțiune antidepressivă utilizate pe larg la tratarea depresiei. O clasă răspândită de medicamente antidepressive sunt inhibitorii monoaminoxidazei (MAO). MAO este o țintă importantă a medicamentelor, deoarece izoformele MAO joacă roluri majore în tulburările neurodegenerative, precum boala Alzheimer și boala Parkinson, și în bolile neuropsihiatrice, cum ar fi depresia [5].

Posibilitatea de a inhiba activitatea fermentului MAO reclamă interacțiuni din diverse clase, dar mai importante pentru studiul centrului activ sunt inhibitorii reversibili competitivi. S-a constatat că inhibitorii MAO reversibili competitivi sunt derivați ai izatinei, în special 2-indolinonei și 2,3-indolinonei, substituți în pozițiile 1 și 5 [6; 7; 8].

În cadrul Laboratorului de Sinteză organică și biofarmaceutică al Institutului de Chimie a fost sintetizat un nou compus din grupul izatinei – Dioxoindolinona (1'-(2-oxo-propil)-spiro [1; 3] dioxolane-2,3'-indolin]-2'-one) (figura 1).

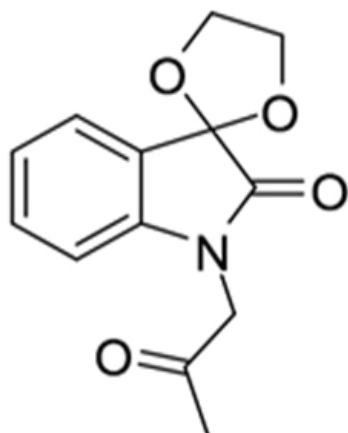


Figura 1. Formula structurii Dioxoindolinonei.

Proprietățile fizico-chimice ale Dioxoindolinonei nu au fost cercetate până în prezent, precum nu au fost determinați nici parametrii de calitate ai acesteia. Lucrarea în cauză vine să lichezeze golul respectiv în studiul Dioxoindolinonei.

MATERIALE ȘI METODE

Cercetările au fost efectuate în cadrul Catedrei de Chimie farmaceutică și toxicologică și al Laboratorului de Analiză, standardizare și control al medicamentului, CȘM al USMF „Nicolae Testemițanu”. În studiu s-au folosit: balanța electronică OHAUS DV215 CD, dispozitivul Melting-Point-Meter KSP11, etuva de uscare, vesela chimică de laborator, reagenți chimici ce corespund cerințelor Ph. Eur. 8.0 [9].

ANALIZA REZULTATELOR OBȚINUTE

Cercetările s-au canalizat pe determinarea unor însușiri fizice, chimice și fizico-chimice ale Dioxoindolinonei: solubilitatea, aspectul soluției, limita de impurități nespecifice, pierderile prin uscare, punctul de topire, precum și pe elaborarea reacțiilor chimice de identificare care pot servi drept caracteristici în controlul calității, inclusiv cel organoleptic.

Studiul caracterelor organoleptice ale substanței. Aspectul, forma cristalelor, culoarea, mirosul și gustul pot oferi primele indicații privind puritatea unui medicament. Deși, potrivit prevederilor Ph. Eur. 8.0, interpretarea acestor însușiri organoleptice nu este obligatorie și are un caracter orientativ, ele nu pot fi neglijate definitiv. Astfel, dacă în urma examenului organoleptic se constată abateri de la prevederile respective, rezultă că substanța în cauză conține impurități provenite de la preparare sau de la conservare, sau că o parte din substanță a suferit diferite procese de descompunere, oxidare etc. [9; 10; 11]. Determinarea caracteristicilor organoleptice s-a efectuat în conformitate cu recomandările și cerințele Ph. Eur. 8.0.

Aspect. Substanța cercetată a fost plasată pe o lamelă de sticlă și examinată cu ochiul liber, apoi examinată sub lupa x 4,5. Aceasta s-a prezentat ca o pulbere cristalină, cu particule mici de forma sferică.

Culoare. Substanța analizată a fost examinată, fiind plasată pe o suprafață mată albă și privită la lumina zilei. Aceasta a fost evaluată ca o substanță de culoare albă cu nuanță bej.

Miros. Pe o lamelă de sticlă au fost extinse circa 0,5-2,0 g de substanța cercetată; peste 15 minute, nu s-a perceput niciun miros specific.

În baza celor efectuate putem concluziona că Dioxoindolinona reprezintă o pulbere cristalină, albă, sau cu nuanță bej, fără miros caracteristic.

Indicii de solubilitate ai Dioxoindolinonei în diferiți solvenți

Solvent	Gradul de solubilitate	Volumul de solvent (în mililitri) necesar pentru a dizolva 1 g de substanță
Apă purificată	Foarte greu solubilă	De la 1000 ml până la 10 000 ml
Alcool etilic	Ușor solubilă	De la 1 ml până la 10 ml
Alcool metilic	Ușor solubilă	De la 1 ml până la 10 ml
Cloroform	Ușor solubilă	De la 1 ml până la 10 ml
Acetonă	Ușor solubilă	De la 1 ml până la 10 ml
Hexan	Foarte greu solubilă	De la 1000 ml până la 10 000 ml
Heptan	Greu solubilă	De la 500 ml până la 1 000 ml

Determinarea solubilității. Dioxoindolinona a fost supusă unei cercetări a solubilității în diferiți solvenți, cum ar fi: apă purificată și solvenți organici (cloroform, acetonă, alcool etilic, alcool metilic, heptan, hexan). În cadrul cercetării s-a luat 1 gram de substanță medicamentoasă, fin pulverizată și cântărită cu o exactitate de 10 mg, care s-a agitat minuțios cu un volum de solvent, în conformitate cu cerințele monografiei, pentru a se evalua gradul de solubilitate a acesteia. Substanța se consideră dizolvată atunci când soluția examinată cu ochiul liber nu mai prezintă particule în suspensie. Nu se iau în considerare urmele de impurități (filamente de hârtie de filtru, vată, tifon) dacă soluția, fără a fi supusă filtrării, corespunde etalonului de transparență. Astfel, în urma celor elaborate și cercetate, s-a determinat că substanța medicamentoasă Dioxoindolinona manifestă următoarele grade de solubilitate, care sunt descrise în tabelul 1.

După cum se vede din tabel, Dioxoindolinona este foarte puțin solubilă în apă, ușor solubilă în alcool, metanol, cloroform, acetonă, greu solubilă în heptan, foarte greu solubilă în hexan.

Metode chimice de identificare a Dioxoindolinonei. La elaborarea reacțiilor de identificare a Dioxoindolinonei s-a ținut cont de prezența în structura ei a grupelor funcționale (grupa aminică terțiară, radical 2-oxopropil în poziția 1) (figura 1).

În conformitate cu prevalența grupelor funcționale în structura chimică a substanței medicamentoase Dioxoindolinona, au fost propuse următoarele reacții.

Reacții ce confirmă prezența grupei amine terțiare. Prezența grupei amine terțiare în compuși chimici poate fi confirmată cu ajutorul reactivelor generale de precipitare și reacțiilor de culoare.

Reacții cu reactivi de precipitare. Pentru determinarea azotului terțiar, au fost propuse reacțiile de identificare cu următorii reactivi: acidul picric, reactivul Dragendroff, soluția apoasă de iod 0,1 mol/l.

Se dizolvă 1 g Dioxoindolinonă în acid clorhidric 100 g/l. La 2 ml soluție obținută se adaugă 2-3 picături de reactiv. La adăugarea soluției de acid picric nu se observă schimbări în soluția cercetată, la adăugarea reactivului Dragendroff se ivește o opalescență, iar la adăugarea soluției apoase de iod 0,1 mol/l – un precipitat de culoare brun-roșietică.

În baza rezultatelor obținute pentru identificarea Dioxoindolinonei se propune reacția cu soluția apoasă de iod 0,1 mol/l în mediu acid.

Reacțiile cu reactivi de culoare. Pentru determinarea azotului terțiar, au fost propuse reacțiile de identificare cu reactivii: acidul nitric concentrat, acidul sulfuric concentrat, amestec al acestor doi acizi.

Câteva cristale de substanță se aplică pe lamela de sticlă și se umectează cu 1-2 picături de reactive. Apare colorația.

În baza rezultatelor obținute pentru identificarea Dioxoindolinonei se propun reacțiile cu reactivi de precipitare [acid nitric (conc.), acid sulfuric (conc.), amestec de acid sulfuric (conc.) și acid nitric (conc.)].

Reacțiile ce confirmă prezența radicalului 2-oxopropil în poziția 1. Se urmărește determinarea prezenței restului de acetonă în poziția 1 a substanței, cu ajutorul reacțiilor de oxido-reducere. Cetonele sunt compuși activi, însă nu se supun oxidării la interacțiunea cu oxidanți slabi. Pentru identificarea compusului cercetat au fost efectuate reacțiile de formare a iodoformului, reacțiile cu sulfat de cupru (II) și tartrat de potasiu și sodiu-soluție (reactivul Fehling), reacția cu soluția amoniacală de nitrat de argint (reactivul Tollens).

Reacția de formare a iodoformului.

0,1 g substanță se dizolvă în 5 ml apă la fierbere, se adaugă 1 ml soluție hidroxid de sodiu 100 g/l și 1 ml iod 0,1 mol/l și se încălzește la aproximativ 40 °C; miros caracteristic de iodoform nu se percepe.

Tabelul 2

Reacțiile de oxido-reducere
ale Dioxoindolinonei

Nr.	Reactivul, reacția	Efectul analitic	Sensibilitatea reacției
1	Formarea iodoformului	-	-
2	Reactivul Fehling	precipitat roșu-cărămiziu	250 $\mu\text{g}/\text{ml}$
3	Reactivul Tollens	„oglină de argint”	1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Reacția cu reactivul Fehling.

0,05 g substanță se dizolvă în 5 ml apă, se adaugă 3 ml sulfat de cupru (II), tartrat de potasiu și sodiu-soluție (reactivul Fehling) care se încălzește până la fierbere; se formează un precipitat roșu-cărămiziu. Sensibilitatea limită a reacției este de 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Reacția cu reactivul Tollens.

0,05 g substanță se dizolvă în 5 ml apă, se adaugă 3 ml soluție amoniacală de nitrat de argint (reactivul Tollens) și se încălzește până la fierbere; pe pereții eprubetei se formează un precipitat argintiu. Sensibilitatea limită a reacției este de 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Datele sunt prezentate în tabelul 2.

În baza rezultatelor obținute pentru identificarea Dioxoindolinonei se propune reacția cu reactivul Fehling.

Aspectul soluției. Unul dintre parametrii de calitate ai substanțelor medicamentoase este aprecierea aspectului și vizează claritatea soluțiilor și colorația lor. Conform cerințelor Ph. Eur. 8.0, soluția substanței se consideră limpede și incoloră dacă aspectul și culoarea acesteia nu se deosebește de apă sau de solventul folosit la prepararea acesteia [9]. Dacă în urma examenului efectuat aspectul soluției diferă de soluția de referință, concluzionăm că substanța respectivă conține impurități care pot apărea la preparare, conservare sau transportare incorectă. Pornind de la solubilitate, a fost determinat aspectul soluției alcoolice de Dioxoindolinonă.

0,1 g substanță se dizolvă în 10 ml alcool. Soluția obținută a fost examinată prin compararea cu volumul egal de solvent în eprubete incolore, cu diametrele (interior și exterior) egale. Soluția de analizat nu depășește claritatea solventului.

Pentru determinarea colorației soluției, s-a efectuat compararea soluției de cercetat cu un volum egal de solvent, privind straturile de lichid de sus în jos, pe un fond alb. Colorația soluției de analizat nu diferă de colorația solventului. Rezultatul obținut permite să concluzionăm că soluția alcoolică a Dioxoindolinonei este transparentă și incoloră.

Tabelul 3

Pierderile prin uscare
ale Dioxoindolinonei

Nr. măsurărilor	Masa până la uscare, g	Masa după uscare, g	ω (%) H_2O
1	0,99106	0,98884	0,224%
2	0,99057	0,98834	0,225%
3	0,99057	0,98834	0,225%

Pierdere prin uscare. Prin determinarea umidității și a pierderii prin uscare, se urmărește stabilirea cantității de apă de cristalizare din substanțele cristalizate și a apei reziduale constituite din apa rămasă din procesul de fabricație, a celei absorbite din atmosferă la conservare, precum și pierderea de substanțe volatile care are loc prin încălzire la o temperatură anumită.

Conținutul substanțelor volatile și a apei a fost determinat prin metoda de uscare în etuvă [9]. Fiola de cântărire cu substanța analizată a fost ținută în etuvă la o temperatură de 105 $^{\circ}\text{C}$, timp de 3 h, apoi răcită în exsicator și cântărită. Operația de uscare s-a repetat, pe perioade de câte 1 h, urmată de răcire în exsicator și cântărire, până la masă constantă. Datele sunt expuse în tabelul 3.

Rezultatele obținute demonstrează că în substanța medicamentoasă cercetată, conținutul apei constituie 0,225 %. Aceasta ne permite să constatăm că Dioxoindolinona nu este higroscopică.

Determinarea punctului de topire. Punctul de topire al unui corp chimic bine definit, în stare de puritate și sub formă cristalină bine determinată, este caracteristică corpului cu condiția că presiunea este constantă. Determinarea punctului de topire a substanței de cercetat s-a realizat la dispozitivul Melting-Point-Meter KSPII.

Punctul de topire a fost determinat conform prevederilor Ph.Eu. 8.0, fiind efectuate trei măsurări. Rezultatele sunt expuse în tabelul 4.

Tabelul 4

Determinarea punctului de topire
a Dioxoindolinonei

Nr. măsurărilor	Punctul de topire
1	127,1 $^{\circ}\text{C}$
2	127 $^{\circ}\text{C}$
3	127,1 $^{\circ}\text{C}$

În urma celor cercetate, se poate deduce că substanța analizată Dioxoindolinona își manifestă punctul de topire la temperatura de 127 °C.

Determinarea impurităților nespecifice. Impuritățile într-o substanță medicamentoasă pot surveni din mai multe cauze: în urma procesului de fabricație, de sinteză, dintr-o purificare incompletă sau conservare necorespunzătoare cerințelor monografiei.

La cercetarea substanței de analizat s-a pus drept scop determinarea limitelor de impurități de cloruri și sulfati.

Controlul limitei de cloruri. Ionul de clorură la interacțiune cu nitratul de argint formează o opalescență, o turbureală sau un precipitat alb, cazeos de clorură de argint, care este practic insolubil în acid nitric, solubil în amoniac [11].

0,5 g de substanță se dizolvă în 20 ml de apă purificată, se filtrează, 15 ml de filtrat se supun probei la cloruri. Conform cerințelor PhE 8.0, la 15 ml soluție de analizat se adaugă 1 ml de acid nitric, apoi amestecul se toarnă la o singură adăugare într-o eprubetă unde se conține 1 ml de soluție nitrat de argint. Proba-etalon se prepară în aceeași manieră, folosind 10 ml de soluție-standard (5ppm Cl⁻) și 5 ml apă. Se lasă la întuneric timp de 5 min. La compararea lichidelor soluția de analizat nu prezintă opalescență mai intensă decât opalescența soluției-etalon.

În urma cercetărilor s-a demonstrat că prezența impurităților de cloruri în Dioxoindolinonă este de cel mult 0,02%.

Controlul limitei de sulfati. Ionul sulfat la interacțiune cu sărurile de bariu formează o turbureală sau un precipitat alb de sulfat de bariu, care este practic insolubil în acid clorhidric [11].

0,5 g de substanță se dizolvă în 20 ml de apă purificată, se filtrează, 15 ml de filtrat se supun probei la sulfati.

La 4,5 ml soluție standard sulfati (10 ppm SO₄²⁻) se adaugă 3 ml soluție clorură de bariu 250 g/L, se agită și se lasă în repaos 1 min. La 2,5 ml de soluție obținută se adaugă 15 ml soluție de analizat și 0,5 ml acid acetic. Soluția de referință se prepară în manieră identică, folosind 15 ml soluție standard sulfati (10 ppm SO₄²⁻) în loc de soluție de analizat. Se compară după 5 min. Soluția de analizat nu prezintă opalescență mai intensă decât opalescența soluției-etalon.

În urma cercetărilor s-a demonstrat că substanța de analizat Dioxoindolinona nu depășește limita impurităților de sulfati comparativ cu proba-etalon (cel mult 0,02%).

CONCLUZII

Au fost studiați parametrii de calitate pentru Dioxoindolinonă. În urma cercetărilor s-a demonstrat că Dioxoindolinona prezintă o pulbere cristalină, albă cu nuanță bej, fără miros; este foarte puțin solubilă în apă, ușor solubilă în alcool, metanol, cloroform, acetonă, greu solubilă în heptan, foarte greu solubilă în hexan; nu este higroscopică (pierderile prin uscare constituie cel mult 0,5%); are punctul de topire de 127 °C; din impurități nespecifice a fost determinată limita de cloruri și sulfati (cel mult 0,02 %). Au fost elaborate reacțiile chimice de identificare a Dioxoindolinonei, astfel sunt propuse reacțiile cu reactivii: Dragendroff; soluția apoasă de Iod 0,1 mol/l; acidul sulfuric (conc.); acidul nitric (conc.); amestec de acid sulfuric (conc.) și acid nitric (conc.); reactivul Fehling.

Rezultatele cercetărilor efectuate vor fi folosite în vederea elaborării Documentației Analitice de Normare pentru Dioxoindolinonă.

BIBLIOGRAFIE

1. Anderson I. and al. NICE clinical Guideline 90 (October 2009). Depression: the treatment and management of depression in adults. London, 64 p.
2. Bschor T., Bauer M., Adli M. Chronic and Treatment Resistant Depression. Dtsch Arztebl Int. 2014, 111(45), p. 766-776.
3. WHO. World Mental Health Surveys, 2008. Global Perspectives on the Epidemiology of Mental Disorders. Eds: R.C. Kessler, T.B. Ustun. Geneva: WHO 2008. 698 p.
4. Fava M., Davidson KG. Definition and epidemiology of treatment-resistant depression. In: Psychiatr Clin North Am. 1996, 19(2), p. 179-200.
5. Beer, F., Petzer J.P., Petzer A. Monoamine oxidase inhibition by selected dye compounds. In: Chem Biol Drug Des. 2019 Dec 13. DOI: 10.1111/cbdd.13654. [Epub ahead of print].
6. Virsis I. E., Grinberg B. A., et. al. Vzaimosvyaz' mezhdru strukturoy 2-indolinonov i 2, 3-indolinonov i ikh biologicheskoy aktivnost'yu. In: Khimiko-farmatsevticheskoy zhurnal, №. 8, 1985, p. 953-956.
7. Geronikaki A., Babaev E., et. al. Design, synthesis, computational and biological evaluation of new anxiolytics. In: Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2004, p. 6560- 6568.
8. Zhunghietu G. Isatin β – ethylenketals as phychotropics. In: Revue Roumaine de Chimie. 2001, 46 (5), p. 517-520.
9. European Pharmacopoeia-8th edition, vol. 1, 1456 p.
10. Bojișă M., Săndulescu R., et. al. Analiza și controlul medicamentelor. Volumul 1. Deva: Intelcredo, 2003, 495 p.
11. Farmacopeea Română, ediția a X-a, 1993, 1315 p.