

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ОКСИКОБАЛАМИНА ГИДРОХЛОРИДА

© А. А. Конарев

«ГНЦ «НИОПИК»,
141700, г. Долгопрудный, Московская обл, ул. Лихачевский проезд, д. 7
E-mail: konarev.niopik@gmail.com

Поступила в Редакцию 23 августа 2024 г.

После доработки 23 марта 2025 г.

Принята к публикации 23 марта 2025 г.

Исследовано влияние условий (материала катода, плотности тока, температуры, концентрации исходного вещества и соляной кислоты) на препаративный электросинтез оксикобаламина гидрохлорида (ОК) восстановлением витамина В₁₂ в кислой среде, на выход целевого продукта и его качество (подлинность, содержание основного вещества, pH раствора, отсутствие примесей). Определены оптимальные условия препаративного электросинтеза оксикобаламина гидрохлорида и его показатели качества, обеспечивающие выход по веществу 82.0–87.0%. Условия электросинтеза апробированы в опытно-промышленном масштабе на технологической схеме с разработанным электролизером фильтр-прессной конструкции на токовую нагрузку 100 А. Лекарственный препарат «Оксикобаламин-лио», изготовленный из фармакопейной субстанции оксикобаламина гидрохлорида, стабилен при его хранении в течение 22–30 мес по физико-химическим и медико-биологическим параметрам, нормированным фармацевтической статьей ВФС 42-660-99, что свидетельствует о требуемом качестве исходной субстанции ОК.

Ключевые слова: витамин В₁₂; оксикобаламин гидрохлорид; препаративный электросинтез

DOI: 10.31857/S0044461825010018; EDN: LKFJEL

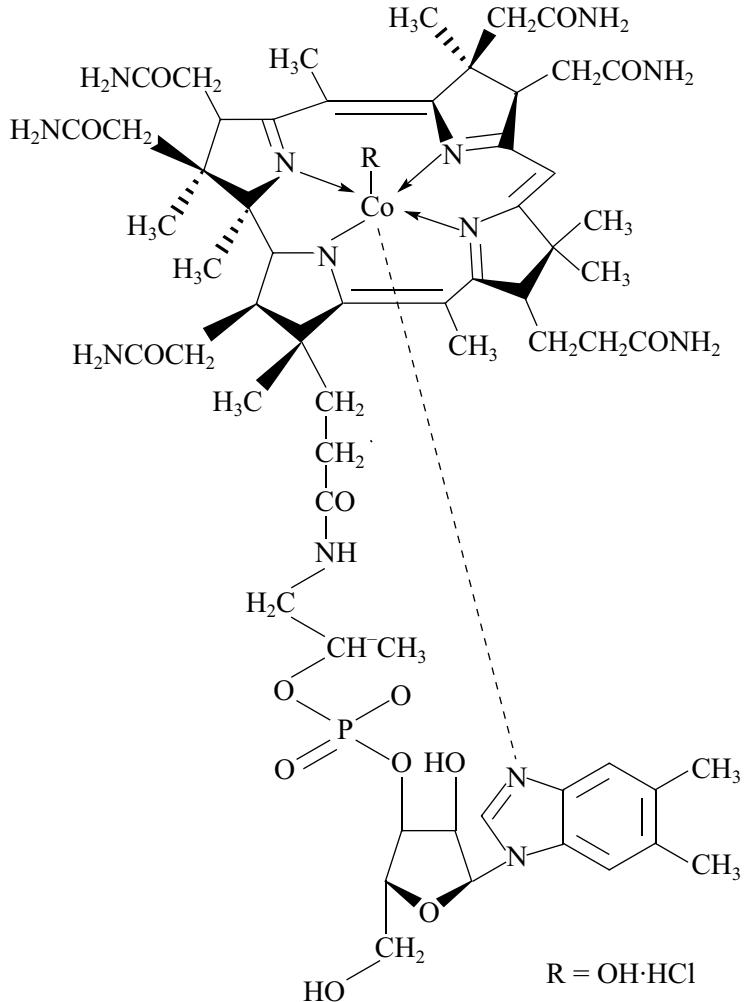
В последнее десятилетие ведется большая исследовательская работа по созданию каталитических бинарных и многокомпонентных систем препаратов с терапевтическим противоопухолевым эффектом, одним из компонентов которых является препарат «Оксикобаламин-лио» [1]. Последний представляет собой сухую инъекционную форму оксикобаламина гидрохлорида [химическое название Со^α-(5,6-диметилбензимидазолил)-Со^β-гидроксикобамид, C₆₂H₈₉CoN₁₃O₁₅P·HCl] — производного витамина В₁₂. Исходное сырье для получения этого лекарственного препарата — фармакопейная субстанция ОК (см. схему).

Медико-биологические исследования *in vitro* и *in vivo*, проведенные в МНИОИ им. П. А. Герцена,

показали, что бинарная каталитическая система «Оксикобаламин-лио»—аскорбиновая кислота имеет широкий спектр противоопухолевого действия и обладает выраженным синергизмом с известными противоопухолевыми препаратами. Высокую эффективность и низкую токсичность эта каталитическая система показывает при лечении опухолевых плевритов, обладая как противоопухолевым, так и плевроплеклерозирующим эффектом [2]. При этом был использован оксикобаламин гидрохлорид, полученный в АО «Синтез» фотолизом витамина В₁₂, соответствующий по своему качеству требованиям временной фармацевтической статьи ВФС 42-660-99.

В научной и патентной литературе приводится ряд способов получения оксикобаламина гидрохло-

Схема



рида из витамина B_{12} , заключающихся в восстановлении Co^{3+} цианокобаламина до Co^{2+} с отрывом CN-группы и обратном окислении Co^{2+} до Co^{3+} с образованием оксикобаламина гидрохлорида, в частности химические, каталитические, фотохимические и электрохимические.

Для получения оксикобаламина гидрохлорида исследованы в качестве восстановителей: метабисульфиты щелочных металлов [3], соли двухвалентного железа (FeSO_4) [4] или цинка [5]. Химические методы восстановления витамина B_{12} в ОК имеют следующие недостатки: нестабильность используемых восстановителей, медленное и неполное протекание реакции с одновременным значительным разрушением целевого продукта, а также сложность обеспечения условий реакции и необходимость регенерации серебра.

Недостаток каталитических методов — использование дорогостоящих металлов или их солей, в

частности $\text{Na}(\text{PdCl}_4)$ [6], а также дорогостоящего оборудования (автоклавов) и взрывоопасного водорода.

Фотохимическая же технология получения ОК многостадийна и трудоемка из-за применения хроматографической очистки получаемого продукта. Кроме того, выход продукта по этой технологии не приводится, что также затрудняет оценку эффективности фотохимического способа синтеза, поскольку выход продукта — важный технико-экономический показатель разрабатываемой технологии [6].

Известный электрохимический метод получения ОК [7] также не способствует его применению в промышленном масштабе из-за использования ртутного катода и потенциостатического режима восстановления витамина B_{12} .

В связи с многочисленными технологическими недостатками перечисленных способов синтеза ОК возникла задача поиска и разработки альтернативной технологии синтеза, которой может стать эффектив-

ная безреагентная мембранные электрохимическая технология синтеза ОК.

Цель исследования — разработка такой безреагентной мембранные электрохимической технологии получения фармакопейной субстанции ОК восстановлением витамина В₁₂ в кислой среде, применяемой для получения лекарственного препарата «Оксикобаламин-лио».

Экспериментальная часть

Для поиска и оптимизации условий электросинтеза ОК восстановлением витамина В₁₂, а также оценки качества получаемого продукта использовали циклическую вольтамперометрию на стеклоуглероде (СУ) и промышленный электролиз в гальванистическом режиме. Циклические вольтамперограммы (ЦВА) регистрировали на полярографе ПУ-1 в классическом и дифференциальном режимах, применяя стационарный электрод из стеклоуглерода марки СУ-2000 (компания «ЛабХимСнаб») в виде стержня с диаметром торца 2 мм [8].

Ячейкой служил конический стеклянный сосуд объемом 20 см³ с рубашкой для термостатирования. Электрод сравнения — насыщенный каломельный электрод, относительно которого приведены значения всех измеренных потенциалов (он был использован также и как вспомогательный электрод).

Для получения воспроизводимых результатов стеклоуглерод шлифовали на мелкозернистой наждачной бумаге Р400, полировали до зеркального блеска фетром, пропитанным глицерином марки ПК-94 с оксидом алюминия марки АОА-1. После промывки дистиллированной водой электрод выдерживали в концентрированной серной кислоте квалификации х. ч. (завод ПАО «ФосАгро») и снова тщательно промывали. Перед записью каждой вольт-амперной кривой электрод промывали водой и высушивали фильтровальной бумагой. В начале каждого опыта для удаления кислорода из электролита в него подавали азот, который также находился над поверхностью исследуемого раствора благодаря гидравлическому затвору, расположенному на электрохимической ячейке.

Промышленный электросинтез ОК в гальванистическом режиме проводили в лабораторном электролизере, изготовленном из закаленного стекла марки М1 с разделением катодного и анодного пространств катионообменной мембраной МК-40 (завод ООО «ИП Щекиноазот»). Термостатируемый стеклянный электролизер имел пришлифованную крышку, в которой предусмотрены штуцеры для термометра,

отбора проб, отвода газов из катодного и анодного пространств, а также для токоподводов к электродам.

Для электролиза применяли катоды из различных конструкционных материалов: титан марки ВТ1-0, графит, медь, никель, нержавеющая сталь Х18Н10Т и платина в виде перфорированного цилиндра с поверхностью 0.30 дм². Анодом служила платиновая пластинка марки Пл.99.9 ГОСТ 13498-79. Рабочий объем электролизера составлял 0.060–0.070 л. Необходимую температуру католита поддерживали с помощью термостата U-15 (Anchem). Перемешивание электролита осуществляли магнитной мешалкой ММ-3М.

Для масштабирования и уточнения условий электросинтеза ОК электролиз в гальванистическом режиме проводили на укрупненной лабораторной и опытно-промышленной установках на токовую нагрузку 20 и 100 А соответственно. Каждая из установок состояла из электролизера, промежуточных стеклянных емкостей с рубашкой для анолита и католита, двух насосов, фазоразделителей, выпрямителя тока, амперметра, вольтметра и трубопроводов с арматурой. Аппаратурная технологическая схема электросинтеза оксикобаламина гидрохлорида восстановлением витамина В₁₂ в опытно-промышленном масштабе приведена на рис. 1.

Лабораторный электролизер представлял собой двухкамерный аппарат фильтр-прессной конструкции с разделением анодного и катодного пространств

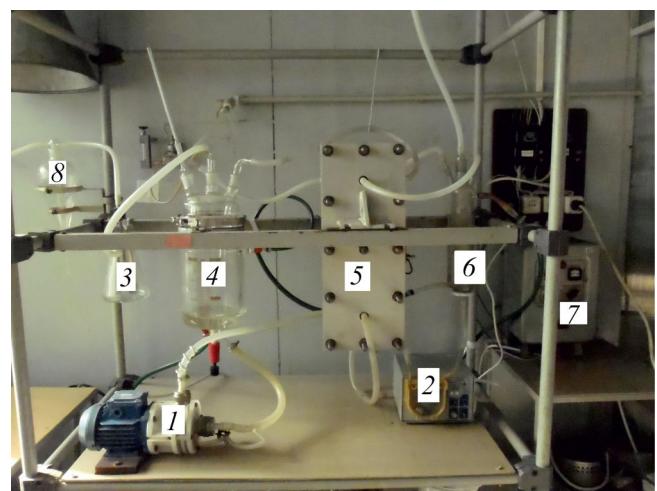


Рис. 1. Аппаратурная технологическая схема электросинтеза оксикобаламина гидрохлорида на Опытном заводе ФГУП «ГНЦ «НИОПИК».

1 — насос для циркуляции раствора витамина В₁₂, 2 — насос для циркуляции анолита, 3 — емкость для раствора гидроксида натрия, 4 — емкость с рубашкой для раствора витамина В₁₂, 5 — мембранный электролизер, 6 — емкость с рубашкой для анолита, 7 — выпрямительный агрегат, 8 — емкость для обезвреживания цианистого натрия.

катионообменной мембраной МК-40. Катод применяли в виде перфорированной пластины из никеля марки Н3 (завод ПАО «ГМК «Норильский никель») с рабочей поверхностью 1 дм², анодом служила пластина с такой же поверхностью из платинированного титана с толщиной платины 3.2 мкм. Анолитом служил 10%-ный раствор серной кислоты квалификации х.ч. Подачу и циркуляцию анолита и католита через соответствующие электродные камеры электролизера осуществляли шестеренчатыми насосами производительностью 150–180 л·ч⁻¹ из промежуточных стеклянных терmostатируемых емкостей. Объем католита составлял 0.25–0.30 л, объем анолита — 0.15–0.20 л. В качестве источника тока использовали выпрямитель марки ВСА-5А-К (компания «Вертекс»). Силу тока в цепи и напряжение на ячейке и фильтр-прессном электролизере измеряли вольтамперметрами М2018 (завод АО «Электроприбор»).

Опытно-промышленный электролизер представлял собой мембранный аппарат фильтр-прессного типа с двумя монополярными ячейками (рис. 2). Каждая ячейка включала в себя катод с рабочей поверхностью 4 дм² и анод с такой же поверхностью, отделенные друг от друга катанообменной мембраной МК-40. Катоды изготовлены из титана марки ВТ1-0 в виде пластины, аноды — из платинированного титана с толщиной платины 3.2 мкм. Катионообменная мембрана зажата между промежуточными рамами, которые обеспечивают межэлектродное расстояние 5 мм.

Монополярные ячейки разделены между собой вставкой, имеющей в нижней и верхней частях от-

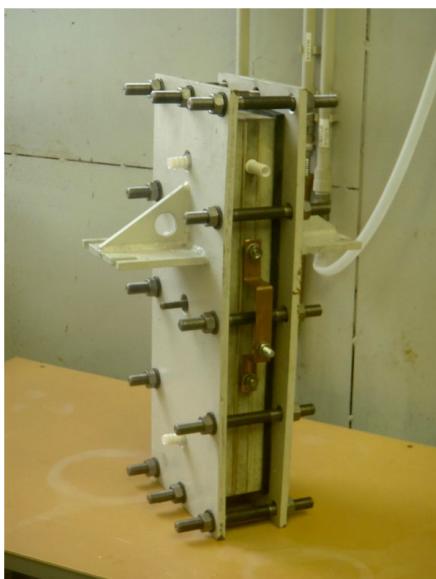


Рис. 2. Опытно-промышленный мембранный электролизер на токовую нагрузку 100 А.

верстия, служащие соответственно для подвода электролита в катодные пространства обеих ячеек и вывода продуктов электролиза из них. Для этой же цели служат соответствующие отверстия в катодах. Циркуляцию католита осуществляли центробежным насосом из полипропилена, обеспечивая линейную скорость католита 0.35 м·с⁻¹.

В анодное пространство электролит поступает через нижнее отверстие в анодах и крайних рамках, продукты электролиза выводятся через отверстия в верхней части анодов и крайних рамках. Циркуляцию анолита осуществляли шестеренчатым насосом из фторпласта производительностью 120 л·ч⁻¹. Источником питания опытно-промышленного электролизера является преобразователь марки ВАКГ-18/9-320 (Быстровский электротехнический завод). На опытно-промышленной установке предусмотрена схема улавливания синильной кислоты, образующейся при отщеплении CN-группы от молекулы витамина В₁₂ в ходе электролиза, гидроксидом натрия и дальнейшее обезвреживание ее соли гипохлоритом натрия или железным купоросом, а для оценки содержания цианидов в фильтратах, получаемых при выделении продукта из растворов, нами разработана фотометрическая методика определения массовой концентрации цианидов, основанная на превращении цианида в хлорциан и взаимодействии последнего с пиридином и барбитуровой кислотой. Оптическую плотность полученного комплекса измеряли при длине волны $\lambda = 584$ нм. При этом содержание CN⁻-ионов в фильтратах не превышало нормируемой концентрации, не более: 1.0 мг·дм⁻³. Кроме того, технический оксикобаламин гидрохлорид подвергается дополнительной очистке перекристаллизацией, что исключает в фармакопейном продукте наличие CN⁻-ионов.

Окончание процесса восстановления определяли по отсутствию на ТСХ (пластина Silufo, элюент: смесь этанол–вода или ацетон–вода, 1:1) в пробе реакционного раствора пятна, соответствующего R_f 0.4 — исходному витамину В₁₂, раствор последнего также наносили на пластину в качестве свидетеля.

После электролиза кислый раствор оксикобаламина гидрохлорида с pH 0.8–1.0 подвергали окислению при комнатной температуре, барботируя через него сжатый воздух, а затем фильтровали на воронке Бюхнера и выделяли целевой продукт из раствора разбавлением его охлажденным ацетоном до 4–5°C при перемешивании, после чего помещали на ночь в холодильник. Выпавший осадок оксикобаламина гидрохлорида отфильтровывали, промывали на фильтре 10 см³ ацетона, отжимали и высушивали на филь-



Рис. 3. Аппаратурная технологическая схема выделения фармакопейного оксикобаламина гидрохлорида из реакционных растворов и регенерации ацетона в опытно-промышленном масштабе на Опытном заводе ФГУП «ГНЦ «НИОПИК».

1 — реагент для растворения технического оксикобаламина гидрохлорида, 2 — реагент для кристаллизации оксикобаламина гидрохлорида, 3 — реагент для регенерации ацетона, 4 — реагент для приема очищенного ацетона.

трех в течение 2 ч. Аппаратурная технологическая схема выделения оксикобаламина гидрохлорида из реакционных растворов, полученных после электролиза в опытно-промышленном масштабе, приведена на рис. 3.

Анализ полученной субстанции ОК проводили в соответствии с фармацевтической статьей ВФС 42-660-99, в которой рекомендуются ИК- и УФ-спектры в качестве критерия подлинности и чистоты субстанции (табл. 1). Что касается природы наблюдаемых полос поглощения, то, согласно литературным данным [9], максимумы поглощения вызваны электронными переходами в корриновом кольце оксикобаламина и имеют следующие значения: для витамина B₁₂ — 361 и 548 нм, а для ОК — 351 и 525 нм — и совпадают с нашими экспериментальными данными (рис. 4).

Спектральные характеристики ОК определяли с помощью спектрофотометра модели Cergy-100 (Agilent Technologies).

Для исследования сравнительного электрохимического поведения использовали оксикобаламин гидрохлорид фирмы Sigma-Aldrich, который соответствовал требованиям по показателям качества ВФС 42-660-99.

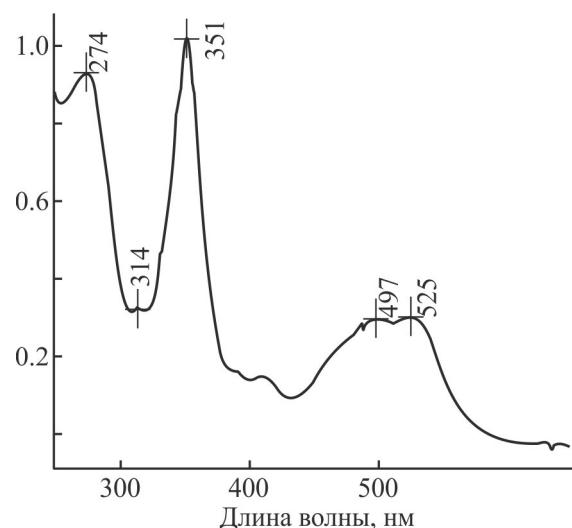


Рис. 4. УФ-спектр оксикобаламина гидрохлорида в ацетатном буферном растворе с pH 4.0.

Таблица 1

Основные показатели качества субстанции оксикобаламина гидрохлорида по временной фармацевтической статье ВФС 42-660-99

| Показатель | Метод | Норма |
|----------------------------|---|---|
| Подлинность | УФ- и видимый спектр | Спектр поглощения 0.02%-ного раствора субстанции в области от 250 до 550 нм имеет максимумы поглощения при 274 ± 2 , 351 ± 2 , 525 ± 3 нм (рис. 4). Соотношения оптических плотностей в приведенных максимумах поглощения составляют: $0.75 < D_{274}/D_{351} < 0.85$; $0.30 < D_{525}/D_{351} < 0.35$ |
| pH | ИК-спектроскопия Гос. фармакопея, XII издание, потенциометрия | Соответствие ИК-спектру От 5.0 до 6.0 |
| Количественное определение | Спектрофотометрия | Не менее 95.0% и не более 102.0% $C_{62}H_{89}CoN_{13}O_{15}P \cdot HCl$ в пересчете на сухое вещество |

Обсуждение результатов

Для разработки процесса электрохимического синтеза ОК восстановлением цианокобаламина (витамина В₁₂) исследовали влияние условий электролиза, в частности материала катода, температуры, плотности тока, концентрации электролита (соляной кислоты) и концентрации исходного витамина В₁₂.

Для всех исследованных катодных материалов выход ОК по веществу изменяется незначительно и составляет 85.3–87.1% (табл. 2). Однако качество получаемого ОК зависит от материала катода, на что указывают спектральные характеристики продукта и содержание основного вещества. Наибольшее содержание основного вещества в продукте получено на металлах со средним перенапряжением выделения водорода (титане, графите, стали X18H10T) и составляет 93.5–96.3%.

На гладком катоде из нержавеющей стали марки X18H10T процесс восстановления витамина В₁₂ в ОК протекает более селективно по сравнению с электродом в виде сетки, что приводит к повышению содержания основного вещества до 93.5%. По-видимому, на сетчатом электроде реализуется менее отрицательный потенциал в результате снижения истинной плотности тока, что затрудняет восстановление витамина В₁₂.

На металлах с низким перенапряжением выделения водорода (платине, никеле и меди) ОК образуется с более низким содержанием основного вещества в выделенном продукте (85.4–88.7%). Вероятно, на этих металлах восстановление Co³⁺ в Co²⁺ тормозится побочной реакцией выделения водорода.

Таким образом, для дальнейших исследований процесса восстановления витамина В₁₂ исходя из качества получаемого ОК и эффективности восстановления в качестве катодного материала рекомендуется графит.

Влияние концентрации электролита — соляной кислоты на процесс восстановления витамина В₁₂ на графитовом катоде исследовали в диапазоне от 0.05 до 0.5 N раствора (табл. 3).

От изменения концентрации соляной кислоты в исследованном интервале зависит как выход ОК по веществу, так и качество получаемого продукта. В растворах соляной кислоты концентрацией 0.1–0.2 N получен наибольший выход ОК по веществу (83.4–85.3%), содержание основного вещества в последних составляет 96.3–98.1%, что соответствует требованиям ВФС 42-660-99.

При дальнейшем увеличении концентрации соляной кислоты до 0.5 N раствора отмечается заметное уменьшение выхода ОК до 78.5%, содержание основного вещества в полученном продукте снижается до 67.3%. По-видимому, с увеличением концентрации соляной кислоты ускоряется побочная реакция выделения водорода, что затрудняет целевой процесс.

В 0.05 N растворе соляной кислоты в католите процесс восстановления витамина В₁₂ осложняется трудностью поддержания температурного режима электролиза из-за низкой электропроводности католита, приводящей к существенному увеличению напряжения на электролизере до 12–14 В, а следовательно, к разогреву католита.

Выход ОК по веществу и его качество существенно зависят от изменения температуры в интервале

Таблица 2

Влияние материала катода на электросинтез осикобаламина гидрохлорила

Условия: температура 30–32°C, плотность тока 5.0 А·дм⁻², концентрация HCl 0.2 N, концентрация витамина В₁₂ 30 г·л⁻¹

| Материал катода | Выход по веществу,* % | Спектральные характеристики продукта | | | Содержание основного вещества, % | |
|-----------------|-----------------------|--------------------------------------|---------------------------------|-------------------|----------------------------------|--|
| | | λ_{max} , нм | отношение оптических плотностей | | | |
| | | | D_{274}/D_{351} | D_{525}/D_{351} | | |
| Титан | 86.5 | 274; 351; 525 | 0.86 | 0.34 | 95.9 | |
| Графит | 85.3 | 274; 351; 525 | 0.83 | 0.35 | 96.3 | |
| Никель | 88.0 | 274; 351; 526 | 0.77 | 0.31 | 85.4 | |
| X18H10T (сетка) | 91.5 | 274; 351; 525 | 0.84 | 0.31 | 85.4 | |
| X18H10T | 87.1 | 274; 351; 526 | 0.84 | 0.34 | 93.5 | |
| Медь | 88.4 | 274; 351; 525 | 0.79 | 0.32 | 88.7 | |
| Платина (сетка) | 85.7 | 274; 351; 525 | 0.86 | 0.34 | 86.5 | |

* Выход оксикобаламина гидрохлорида по восстановлению и выделению из раствора в расчете на 100%-ный продукт.

Таблица 3

Влияние концентрации используемой соляной кислоты на электросинтез оксикобаламина гидрохлорида
Условия: температура 30–32°C, плотность тока 5.0 А·дм⁻², концентрация витамина В₁₂ 30 г·л⁻¹, катод — графит

| Концентрация HCl, N | Выход по веществу,* % | Спектральные характеристики продукта | | | Содержание основного вещества, % | |
|---------------------|-----------------------|--------------------------------------|---------------------------------|-------------------|----------------------------------|--|
| | | λ_{\max} , нм | отношение оптических плотностей | | | |
| | | | D_{274}/D_{351} | D_{525}/D_{351} | | |
| 0.05 | 83.4 | 274; 351; 525 | 0.81 | 0.35 | 96.1 | |
| 0.10 | 85.4 | 274; 351; 525 | 0.82 | 0.34 | 98.1 | |
| 0.20 | 85.3 | 274; 351; 525 | 0.83 | 0.35 | 96.3 | |
| 0.35 | 80.7 | 274; 351; 525 | 0.80 | 0.33 | 96.0 | |
| 0.50 | 78.5 | 274; 351; 526 | 0.81 | 0.22 | 67.3 | |

* Выход оксикобаламина гидрохлорида по восстановлению и выделению из раствора в расчете на 100%-ный продукт.

13–50°C (табл. 4). При более низкой температуре электролиза наблюдается заметное снижение выхода продукта до 60%, что, по-видимому, связано с недостаточной растворимостью исходного витамина В₁₂. Это подтверждается данными ТСХ, а также трудностями удаления образующейся синильной кислоты из реакционного раствора, что исключает возможность полной конверсии цианокобаламина из-за обратимости реакции. Повышение температуры более 40°C также приводит к существенному снижению выхода целевого продукта до 63.5%, очевидно, из-за его термической неустойчивости. Кроме того, при более высокой температуре наблюдается снижение качества целевого продукта, на что указывает завышенное соотношение оптических плотностей D_{525}/D_{351} , составляющее 0.37–0.38 и превышающее нормативное значение — 0.35. Поэтому электросинтез оксикобаламина гидрохлорида предпочтительно проводить при температуре 28–32°C.

Влияние концентрации витамина В₁₂ на процесс его электровосстановления представлено в табл. 5.

Изменение концентрации исходного витамина В₁₂ от 30 до 75 г·л⁻¹ не влияет на качество получаемого оксикобаламина гидрохлорида, так как содержание основного вещества в образцах составляет 99.4–100.0%, а спектральная характеристика продукта соответствует нормативным данным. Однако восстановлению целесообразно подвергать более концентрированные растворы витамина В₁₂, так как при этом повышается выход ОК за счет более полного выделения целевого продукта из раствора. Кроме того, использование для электровосстановления раствора витамина В₁₂ большей концентрации (75 г·л⁻¹) приводит к существенному снижению расхода ацетона на выделение ОК из реакционных растворов. При этом удельный расход ацетона снижается с 0.70–0.71 до 0.4 л·г⁻¹ без учета его регенерации, но остается

Таблица 4

Влияние температуры на электросинтез оксикобаламина гидрохлорида

Условия: концентрация соляной кислоты 0.1 N, концентрация витамина В₁₂ 30 г·л⁻¹, плотность тока 5.0 А·дм⁻², катод — графит

| Температура, °C | Выход по веществу,* % | Спектральные характеристики продукта | | | Содержание основного вещества, % | |
|-----------------|-----------------------|--------------------------------------|---------------------------------|-------------------|----------------------------------|--|
| | | λ_{\max} , нм | отношение оптических плотностей | | | |
| | | | D_{274}/D_{351} | D_{525}/D_{351} | | |
| 13–15 | 60.0 | 275; 353; 527 | 0.85 | 0.35 | 92.0 | |
| 27–28 | 83.0 | 274; 351; 524 | 0.83 | 0.30 | 99.4 | |
| 31–32 | 84.0 | 274; 351; 525 | 0.82 | 0.31 | 96.3 | |
| 33–34 | 85.4 | 274; 351; 525 | 0.82 | 0.38 | 98.0 | |
| 48–50 | 63.7 | 276; 351; 525 | 0.85 | 0.37 | 95.0 | |

* Выход оксикобаламина гидрохлорида по восстановлению и выделению из раствора в расчете на 100%-ный продукт.

Таблица 5

Влияние концентрации витамина В₁₂ на выход оксикобаламина гидрохлорида при электровосстановлении
Условия: концентрация соляной кислоты 0.1 N, температура 27–28°C, плотность тока 5.0 A·dm⁻², катод — графит

| Концентрация витамина В ₁₂ , г·л ⁻¹ | Выход по веществу,* % | Спектральные характеристики продукта | | | Содержание основного вещества, % | |
|---|-----------------------|--------------------------------------|---------------------------------|-------------------|----------------------------------|--|
| | | λ_{\max} , нм | отношение оптических плотностей | | | |
| | | | D_{274}/D_{351} | D_{525}/D_{351} | | |
| 30 | 83.0 | 274; 351; 524 | 0.83 | 0.30 | 99.4 | |
| 60 | 82.7 | 274; 351; 524 | 0.78 | 0.35 | 98.0 | |
| 75 | 87.3 | 274; 351; 525 | 0.79 | 0.34 | 97.8 | |

* Выход оксикобаламина гидрохлорида по восстановлению и выделению из раствора в расчете на 100%-ный продукт.

большим, поэтому возникает необходимость его регенерации из водно-ацетоновых фильтратов.

Изменение плотности тока от 2.5 до 10.0 A·dm⁻² при восстановлении витамина В₁₂ концентрацией как 60, так и 75 г·л⁻¹ не влияет на качество получаемого ОК, но выход последнего по веществу в данном интервале плотностей тока выше при восстановлении более концентрированных растворов витамина В₁₂. Повышение плотности тока выше 10.0 A·dm⁻² при концентрации витамина В₁₂ 60 г·л⁻¹ усложняет поддержание температурного режима процесса восстановления и может приводить к более глубокому восстановлению Co³⁺, что снижает выход ОК по веществу (табл. 6).

В работе [7] показано, что при электровосстановлении ОК на ртутном катоде при потенциале –1.2 В образуется неидентифицированная примесь (около 15%), регистрируемая на полярограмме в виде дополнительной волны *b* с $E_{1/2} = -0.55$ В (рис. 5). Эту волну наблюдали ранее и другие исследователи [10]. На полярографической кривой восстановления ОК, регистрируемой на фоне 0.1 M NaNO₃, наблюдаются

три волны: волны *a* с $E_{1/2} = -0.05$ В и *c* с $E_{1/2} = -0.97$ В обусловлены восстановлением ОК, а волна *b* вызвана восстановлением неидентифицированного побочного продукта.

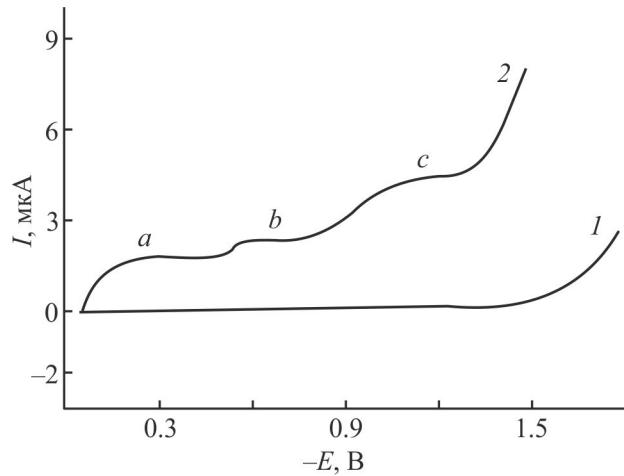


Рис. 5. Полярограмма восстановления оксикобаламина гидрохлорида (2) на фоне 0.1 M NaNO₃ (1) (по данным [7]).

Таблица 6

Влияние плотности тока на выход оксикобаламина гидрохлорида при его электросинтезе

Условия: концентрация витамина В₁₂ 60 г·л⁻¹, концентрация HCl 0.1 N, температура 27–28°C, катод — графит

| Плотность тока, A·dm ⁻² | Выход по веществу,* % | Спектральные характеристики продукта | | | Содержание основного вещества, % | |
|------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|---------------------------------|-------------------|----------------------------------|--|
| | | λ_{\max} , нм | отношение оптических плотностей | | | |
| | | | D_{274}/D_{351} | D_{525}/D_{351} | | |
| 2.5 | 87.0 | 274; 351; 524 | 0.80 | 0.30 | 96.1 | |
| 5.0 | 82.7 | 274; 351; 524 | 0.78 | 0.35 | 98.0 | |
| 10.0 | 82.3 | 274; 351; 526 | 0.84 | 0.34 | 97.5 | |
| 2.5** | 85.5 | 274; 351; 524 | 0.85 | 0.36 | 98.2 | |
| 5.0** | 87.3 | 274; 351; 525 | 0.79 | 0.34 | 97.9 | |

* Выход оксикобаламина гидрохлорида по восстановлению и выделению из раствора в расчете на 100%-ный продукт.

** Концентрация витамина В₁₂ 75 г·л⁻¹.

Поскольку к фармакопейной субстанции ОК предъявляются жесткие требования к качеству, для обнаружения побочного продукта в ОК, полученном фотохимическим и электрохимическим методами, а также в ОК фирмы Sigma-Aldrich их электрохимическое поведение было исследовано методом ЦВА на СУ (рис. 6–8), так как препартивное восстановление витамина В₁₂ проводится на твердом электроде.

На циклических классической (2) и дифференциальной (3) вольтамперограммах восстановления ОК, полученного фотохимическим методом (рис. 6), как и на полярограмме (рис. 5), регистрируются аналогич-

ные три волны (пика): *a* с $E_p = -0.20$ В, *b* с $E_p = -0.64$ В и *c* с $E_p = -0.94$ В. Волны (*пики*) *a* и *c* обратимы, так как разность потенциалов пиков катодного и анодного предельных токов для волны *a* и волны *c* не превышает 60 мВ, а отношение i_p^k/i_p^a равно ~ 1 , волна (*пик*) *b* необратима. С повышением концентрации ОК (рис. 6, кривая 4) высота наблюдаемых волн (пиков) пропорционально увеличивается. При этом также увеличивается высота пика примеси (кривая 4).

ОК, полученный электрохимическим путем, и ОК фирмы Sigma-Aldrich не содержат побочного продукта, о чем свидетельствует отсутствие его вол-

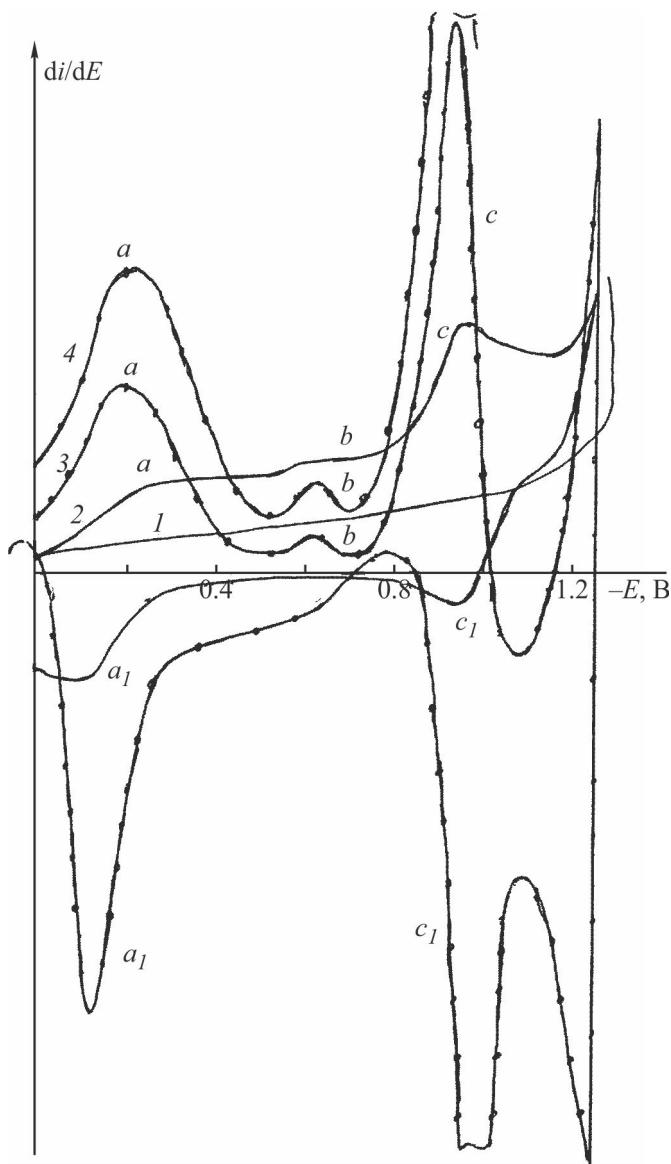


Рис. 6. Циклическая классическая (2) и циклические дифференциальные (3, 4) вольтамперограммы восстановления оксикобаламина гидрохлорида на СУ, полученного фотохимическим методом, на фоне ацетатного буферного раствора с pH 4.0 (1).

Условия: концентрация оксикобаламина гидрохлорида 0.2 (2 и 3) и 0.37 г·л⁻¹ (4), скорость развертки потенциала 20 мВ·с⁻¹.

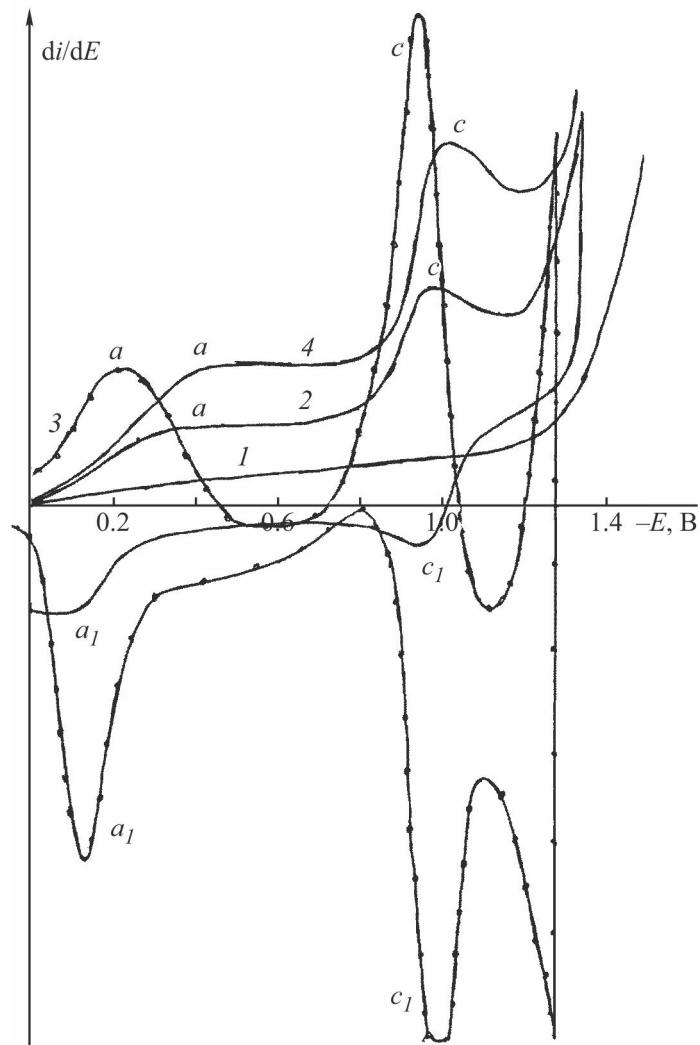


Рис. 7. Циклические классическая (2) и дифференциальная (3) вольтамперограммы и классическая вольтамперограмма (4) восстановления оксикобаламина гидрохлорида на СУ, полученного электрохимическим методом, на фоне ацетатного буферного раствора с pH 4.0 (1).

Условия: концентрация оксикобаламина гидрохлорида 0.1 (2 и 3) и 0.2 г·л⁻¹ (4), скорость развертки потенциала 20 мВ·с⁻¹.

ны восстановления на поляризационных кривых (рис. 7, 8).

Можно предположить, что волна *b* обусловлена восстановлением непрореагированного витамина В₁₂. Однако витамин В₁₂ восстанавливается в аналогичных условиях на СУ при потенциалах более отрицательных по сравнению с потенциалом волны восстановления побочного продукта (рис. 9). При добавлении витамина В₁₂ в раствор оксикобаламина гидрохлорида, полученного фотохимическим методом, наблюдается увеличение высоты волны *c*, а высота волны *b* остается без изменения. Из полученных данных ЦВА следует, что разрабатываемая мембранный электрохимическая технология получения ОК позволяет получать целевой продукт без остаточных

количество непрореагированного витамина В₁₂ и неидентифицированной примеси, регистрируемой полярографическим и вольтамперометрическим методами при $E_{1/2} = -0.55$ и -0.64 В соответственно.

Таким образом, в результате проведенных исследований на укрупненной лабораторной установке найдены условия получения фармакопейного ОК с выходом по веществу 82–87%: катод — графит, плотность тока 2.5–5.0 А·дм⁻², температура 27–30°C, концентрация витамина В₁₂ 60–75 г·л⁻¹, концентрация соляной кислоты 0.1–0.15 N раствор [11], которые были апробированы в опытно-промышленном масштабе (табл. 7).

Лабораторные данные по электрохимическому синтезу ОК хорошо воспроизводятся в опытно-про-

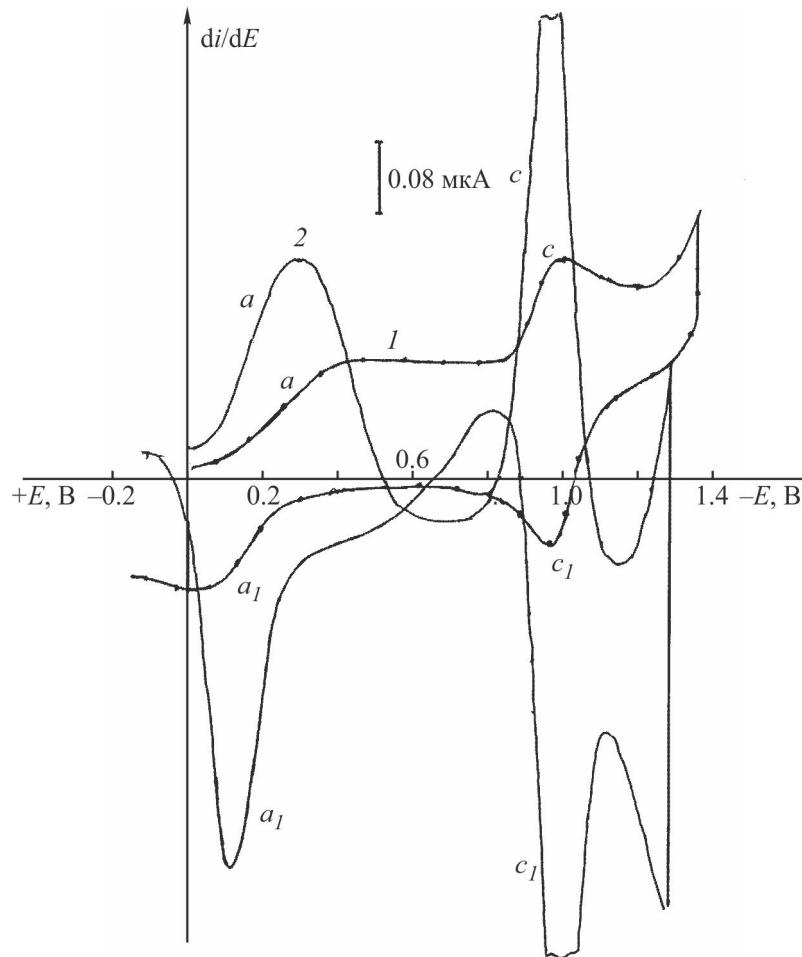


Рис. 8. Циклические классическая (1) и дифференциальная (2) вольтамперограммы восстановления оксикобаламина гидрохлорида на СУ фирмы Sigma-Aldrich на фоне ацетатного буферного раствора с pH 4.0 (1).

Условия: концентрация оксикобаламина гидрохлорида 0.2 г·л⁻¹, скорость развертки потенциала 20 мВ·с⁻¹.

мышленном масштабе как по выходу продукта по веществу, так и по качеству получаемой субстанции (табл. 7). Из фармакопейной субстанции ОК изготовлены шесть серий лекарственного препарата «Оксикобаламин-лио», в которых в МНИОИ им. П. А. Герцена исследованы физико-химические (внешний вид, растворимость, прозрачность, pH, подлинность, количественное определение активного вещества) и медико-биологические свойства (цитотоксическая активность *in vitro* и токсичность) лекарственного препарата «Оксикобаламин-лио» в процессе его хранения в течение 22–30 мес (табл. 8).

Из данных табл. 8 следует, что препарат «Оксикобаламин-лио» при хранении в течение 22–30 мес при рекомендованной температуре хранения (до 25°C) стабилен по физико-химическим и медико-биологическим параметрам, нормированным ВФС

42-660-99. В дальнейшем он был использован для доклинического изучения противоопухолевой активности при лечении широко распространенных форм злокачественных новообразований в схемах монотерапии и показал высокую эффективность при лечении опухолевых плевритов [2]. Кроме того, как видно из данных табл. 9, разработанная мембранные электрохимическая технология получения ОК восстановлением витамина B₁₂ в кислой среде в отличие от технологии фотолиза на АО «Синтез» и известных других методов синтеза ОК, в том числе электрохимического, позволяет получать субстанцию ОК фармакопейного качества с выходом по веществу 82.0–87.0%, исключая при этом использование химических реагентов, дорогостоящих катализаторов и оборудования, а также многостадийность технологии синтеза продукта.

Таблица 7

Электросинтез оксикобаламина гидрохлорида на опытно-промышленной установке

Условия: концентрация HCl 0.1 N, температура 30–31°C, плотность тока 5 А·дм⁻², катод — графит

| Концентрация витамина В ₁₂ , г·л ⁻¹ | Выход по веществу,* % | Спектральные характеристики продукта | | Содержание основного вещества, % | рН субстанции |
|---|-----------------------|--------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------|
| | | λ_{\max} , нм | отношение оптических плотностей | | |
| | | | D_{274}/D_{351} | D_{525}/D_{351} | |
| 39.0 | 81.5 | 273; 351; 525 | 0.85 | 0.34 | 96.5 |
| 74.0 | 84.6 | 274; 351; 525 | 0.83 | 0.34 | 95.6 |
| 74.0 | 84.0 | 274; 351; 525 | 0.78 | 0.32 | 98.2 |
| 74.0 | 86.4 | 274; 351; 524 | 0.81 | 0.34 | 97.5 |
| 74.0 | 83.0 | 273; 351; 523 | 0.85 | 0.33 | 97.0 |
| 74.0 | 86.2 | 274; 351; 525 | 0.76 | 0.34 | 98.0 |
| 74.0 | 84.1 | 274; 351; 525 | 0.82 | 0.33 | 97.8 |

* Выход оксикобаламина гидрохлорида по восстановлению и выделению из раствора в расчете на 100%-ный продукт.

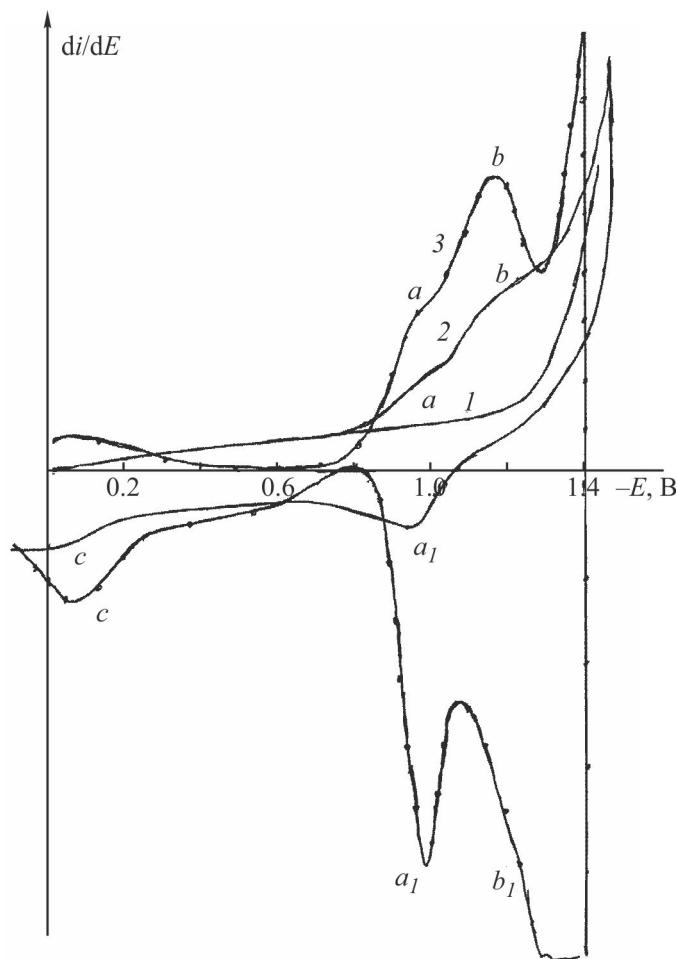
Рис. 9. Циклические классическая (2) и дифференциальная (3) вольтамперограммы восстановления витамина В₁₂ на СУ на фоне ацетатного буферного раствора с pH 4.0 (1).Условия: концентрация витамина В₁₂ 0.2 г·л⁻¹, скорость развертки потенциала 20 мВ·с⁻¹.

Таблица 8

Физико-химические и медико-биологические показатели опытных серий лекарственного препарата «Оксикобаламин-лио» в процессе хранения

| Показатель | Норма (ВФС 42-660-99) | 001; 30 | 002; 30 | Серия препарата; срок хранения, мес |
|---|--|---|------------------------------------|-------------------------------------|
| Внешний вид | Кристаллы или кристаллический порошок темно-красного цвета, без запаха. Гигроскопичен | Кристаллический порошок темно-красного цвета, без запаха. Гигроскопичен | | |
| Растворимость: 10%-ный раствор в H_2O 10%-ный раствор в 0.9% NaCl | Хорошо растворим (визуальная оценка) | Хорошо растворим | 274, 351, 523 | 274, 352, 524 |
| Подлинность: 0.02%-ного раствора оксикобаламина, приготовленного в ацетатном буферном растворе с pH 3.95–4.05 pH: | Электронный спектр: максимумы поглощения: 274 \pm 2; 351 \pm 2; 525 \pm 3 нм $D_{274\text{nm}}/D_{351\text{nm}}$ — 0.70–0.95 $D_{525\text{nm}}/D_{351\text{nm}}$ — 0.30–0.45 | 0.80 0.36 | 0.86 0.38 | 0.77 0.31 |
| 2.5%-ный раствор в H_2O 2.5%-ный раствор в 0.9% NaCl | 5.0–6.0 | 5.28 \pm 0.05 5.44 \pm 0.04 | 5.46 \pm 0.04 5.51 \pm 0.03 | 5.21 \pm 0.03 5.09 \pm 0.02 |
| Содержание активного вещества, % | 95–102 | 97.6 \pm 0.4 | 98.6 \pm 0.5 | 97 \pm 0.3 |
| Цитотоксическая активность, KA^*/IK_{50} | 1.00 \pm 0.30 | 1.03 \pm 0.05/14.9 \pm 0.06 | 1.02 \pm 0.06/15.1 \pm 0.09 | 0.94 \pm 0.04/16.2 \pm 0.08 |
| Токсичность в составе БКС (тест-доза — 175 мг·кг ⁻¹) | Не токсично | Не токсично | Не токсично | Не токсично |

* Коэффициент активности.

Таблица 9
Различные способы получения оксикобаламина гидрохлорида

| Способ получения оксикобаламина гидрохлорида из витамина В ₁₂ и его недостатки | Выход по веществу, % |
|--|----------------------|
| Химический способ [3]: восстановитель метабисульфит натрия. Нестабильность реагента при хранении, необходимость постоянного контроля за его качеством, невозможность использования даже при частичном переходе в окисленную форму и необходимость превращения промежуточного сульфитокобаламина в оксикобаламин с использованием дополнительных, неудобных в работе реагентов, например иода | 87 |
| Химический способ [4]: восстановитель FeSO ₄ . Медленное и неполное протекание реакции с одновременным значительным разрушением продукта реакции, что приводит к заметному снижению выхода продукта | 77 |
| Химический способ [5]: восстановитель — цинковый порошок. Большой расход дорогостоящего и дефицитного цинкового порошка и большое количество неутилизируемого цинкового шлама | 92 |
| Катализитический способ [6]. Дорогостоящие катализатор Na(PdCl ₄) и оборудование — автоклавы, использование взрывоопасного водорода | 88 |
| Электрохимический способ [7]. Ртутный катод, потенциостатический режим электролиза не может быть реализован в промышленном масштабе | Не приводится |
| Разработанный безреагентный мембранный электрохимический метод. Указанные недостатки известных способов синтеза оксикобаламина гидрохлорида не характерны для электрохимического метода | 82.0 – 87.0 |

Выводы

1. В результате исследования препаративного электрохимического восстановления витамина В₁₂ в кислой среде в гальваностатическом режиме разработаны и оптимизированы условия для препаративного мембранного электросинтеза фармакопейной субстанции оксикобаламина гидрохлорида: катод — графит, плотность тока 2.5–5.0 А·дм⁻², температура 27–30°C, концентрация витамина В₁₂ 60–75 г·л⁻¹, концентрация соляной кислоты в католите 0.1–0.15 N, обеспечивающие выход продукта по веществу 82–87%, которые стали основой лабораторного технологического регламента.

2. Для апробации лабораторной технологии синтеза фармакопейной субстанции оксикобаламина гидрохлорида на опытном заводе ФГУП «ГНЦ «НИОПИК» создана опытно-промышленная установка с разработанным мембранным электролизером фильтр-прессного типа на токовую нагрузку 100 А.

3. Методом ЦВА на СУ на фоне ацетатного буферного раствора с pH 4.0 исследовано электровосстановление ОК, полученного электрохимическим, фотохимическим методом и фирмы Sigma-Aldrich, а также витамина В₁₂. В ОК, полученном по разработанной электрохимической технологии, не регистри-

руется неидентифицированный побочный продукт, наблюдаемый полярографическим и вольтамперометрическим методами при $E_{1/2} = -0.55$ и -0.64 В соответственно.

4. Разработанная лабораторная мембранный электрохимическая технология получения фармакопейного оксикобаламина гидрохлорида электрохимическим восстановлением витамина В₁₂ в кислой среде успешно апробирована в опытно-промышленном масштабе на компактной технологической схеме, что свидетельствует о перспективности ее реализации в промышленном масштабе.

5. Физико-химические и медико-биологические свойства лекарственного препарата «Оксикобаламин-лио», изготовленного из фармакопейной субстанции оксикобаламина гидрохлорида, исследованы в МНИОИ им. П. А. Герцена в процессе его хранения. Препарат «Оксикобаламин-лио» при его хранении в течение 22–30 мес при рекомендованной температуре хранения (до 25°C) стабилен по физико-химическим и медико-биологическим параметрам, нормированным ВФС 42-660-99, что свидетельствует о фармакопейном качестве исходной субстанции оксикобаламина гидрохлорида, получаемой по мембранный электрохимической технологии, и возможности его использования для производства лекарственного препарата «Оксикобаламин-лио».

Благодарности

Автор благодарит ведущего научного сотрудника МНИОИ им. П. А. Герцена, д.б.н. Е. Р. Немцову и старшего научного сотрудника МНИОИ им. П. А. Герцена, к.б.н. А. А. Панкратова за данные медико-биологических исследований лекарственного препарата «Оксикобаламин-лио».

Конфликт интересов

Автор подтверждает, что представленные данные не содержат конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Информация об авторах

Конарев Александр Андреевич, г.н.с., руководитель Отдела инновационных мембранных электрохимических технологий ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», д.т.н., заслуженный изобретатель РФ
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0476-3414>

Список литературы

- [1] Сыркин А. Б., Жукова О. С., Кикоть Б. С. Терафтал — новый препарат для бинарной катализической терапии злокачественных опухолей // Рос. хим. журн. 1998. Т. 42. № 5. С. 140–146.
- [2] Пат. РФ 2438667 (опубл. 2012). Способ лечения опухолевых плевритов.
- [3] Pat. China 1323746A (publ. 2001). Prepn. of hydroxocobalamine salt with cyanocobalamin as precursor.
- [4] Pat. Nederland NL6607040A (publ. 1966). Werkijze voor het bereiden van hydroxocobalamine.
- [5] Pat. Great Britan GB1084847A (publ. 1967). Improvements in or relating to industrial production of hydroxocobalamine.
- [6] Bieganowsky R., Klar G. Eine einfache darstellungsweise fur hydroxocobalamin (aqvacobalamin) aus cyanocobalamin // Chemiker-Zeitung. 1982. 106. N 5. S. 235.
- [7] Kenyberez Th. M., Mark H. B. The Simple electrochemical preparation of vitamin B_{12a} (aquocobalamin) from vitamin₁₂ (cyanocobalamin) // Anal. Lett. 1974. V. 7. N 1. P 1–8.
<https://doi.org/10.1080/00032717408059013>
- [8] Пат. РФ 2159424 (опубл. 2000). Способ определения ароматических нитросоединений и продуктов их восстановления.
- [9] Беликов В. Г. Фармацевтическая химия. М.: Медпресс-инфарм, 2007. С. 605–607.
- [10] Hogenkamp H. P. C., Holmes S. Polarography of cobalamin and cobinamides // Biochemistry. 1970. V. 9. N 9. P. 1888–1893.
<https://doi.org/10.1021/bi00811a004>
- [11] Пат. РФ 2368618 (опубл. 2009). Способ получения оксикобаламина.