
РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НОВОГО БАВ, ПРОЯВЛЯЮЩЕГО ГИПОТЕНЗИВНУЮ АКТИВНОСТЬ

Е.А. Непогодина, Л.А. Чекрышкина

Кафедра фармацевтической химии ФДПО и ФЗО
ГОУ ВПО Росздрава «Пермская государственная
фармацевтическая академия Федерального агентства
по здравоохранению и социальному развитию»
ул. Ленина, 48, Пермь, Россия, 614990
тел. +79114636467, эл. почта: somvoz@live.ru

В пермской фармакадемии синтезировано новое биологически активное вещество (БАВ) — N-2(2'-метилфенокси)-этилморфолина гидрохлорид, показавшее высокую гипотензивную активность в испытании на кошках. Проведен комплекс исследований с целью разработки способов идентификации и количественного определения в неводной среде, проведена валидационная оценка методики по показателям: линейность результатов, воспроизводимость и точность в аналитической области методики. Полученные результаты рекомендовано включить в проект фармакопейной статьи на исследуемое БАВ.

Ключевые слова: идентификация производного арилоксиэтанамин, ацидиметрическое титрование в неводной среде, валидация.

Цель исследования — разработка способов идентификации и количественного определения нового БАВ — производного арилоксиэтанамин — N-2(2'-метилфенокси) этилморфолина гидрохлорид ($C_{13}H_{19}NO_2 \dots HCl$, М.м. = 257,76), проявляющего гипотензивную активность [7].

Для установления подлинности использовали физико-химические характеристики и химические реакции.

Соединение характеризовали по температуре плавления (197—198 °С), растворимости, спектральным характеристикам: УФ-, ИК-, 1H ЯМР-спектры, масс-спектр, выполнен дифференциально-термический и термогравиметрический анализ [5].

БАВ легко растворимо в воде, спиртах (этиловом и метиловом), хлороформе, мало — в ацетоне и этилацетате, практически нерастворимо в эфире и гексане.

Разработаны реакции подлинности, обусловленные свойствами функциональных групп в структуре соединения: третичного атома азота морфолинового цикла, кислорода простой эфирной группы, фенильного радикала. Определена чувствительность каждой реакции (табл. 1). Поскольку с кислотой пикриновой БАВ дает кристаллический осадок, ее выполняли также в микрокристаллоскопическом варианте: в поле зрения микроскопа наблюдали пучки желтых игольчатых кристаллов.

Таблица 1

Пределы обнаружения и эффекты реакций изучаемого соединения

№ п/п	Реагент	Эффект реакции	Предел обнаружения, мг
1	Бушарда-Вагнера	аморфный коричневый осадок	0,025
2	Драгендорфа	аморфный оранжевый осадок	0,05
3	Зоненшейна	аморфный белый осадок	0,01
4	Марки	ярко-красное окрашивание	0,036
5	серная к-та конц.	розовое окрашивание, переходящее в красное	0,036
6	азотная к-та конц.	зелено-синее окрашивание	0,5
7	пикриновой кислоты р-р	желтые игольчатые кристаллы, собранные в пучки	0,0125

Одним из важных физико-химических параметров, характеризующих кислотно-основные свойства соединений, является константа ионизации, которая определена для исследуемого вещества как основания в спиртовом и водном растворах (концентрация 0,001 М) потенциометрическим методом. Рассчитанная по результатам титрования величина pK_a составила (5,18 и 6,08 соответственно), что позволяет сделать вывод о слабых основных свойствах исследуемого БАВ.

Для разработки методики количественного определения ацидиметрическим методом в среде протогенного растворителя нами, кроме определения значения pK_a , установлен оптимальный состав протогенного растворителя для титрования; на основе потенциометрического титрования выбраны оптимальные условия количественного определения БАВ.

Состав протогенных растворителей (табл. 2) подбирали, исходя из значений pK_a БАВ и рекомендуемых условий титрования известных лекарственных веществ [3, 4].

Таблица 2

Составы растворителей, используемые при потенциометрическом титровании БАВ

№ п/п	Состав среды растворения	Соотношения реагентов
1	кислота муравьиная уксусный ангидрид	1 : 10, 2 : 10
2	уксусная кислота безводная ртути окисной ацетата раствор	10 : 5, 15 : 5, 10 : 3, 15 : 3
3	уксусная кислота безводная уксусный ангидрид	10 : 10

Навеску БАВ титровали 0,1 М раствором кислоты хлорной в безводной уксусной кислоте до появления скачков ЭДС.

Как показали результаты экспериментов, на кривых титрования в смесях, состоящих из безводной уксусной кислоты и раствора ацетата окисной ртути во всех соотношениях, видны четкие скачки потенциала (рис. 1). График зависимости $\Delta E/\Delta V$ от объема (титранта) показывает, что смесь 15 мл уксусной кислоты безводной и 3 мл ацетата окисной ртути дает более выраженный скачок потенциала в точке эквивалентности (рис. 2). Таким образом, в дальнейшем использовали данную смесь для титрования, а в качестве индикатора — 0,1% раствор кристаллического фиолетового в безводной уксусной кислоте.

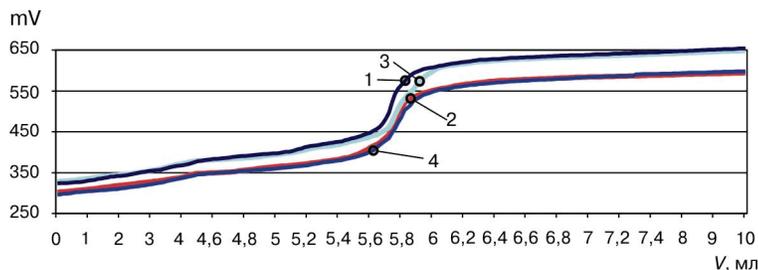


Рис. 1. Кривые титрования исследуемого БАВ 0,1 М раствором кислоты хлорной:

- 1 — 15 мл CH_3COOH + 3 мл $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$; 2 — 15 мл CH_3COOH + 5 мл $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$;
3 — 10 мл CH_3COOH + 3 мл $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$; 4 — 10 мл CH_3COOH + 5 мл $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$;

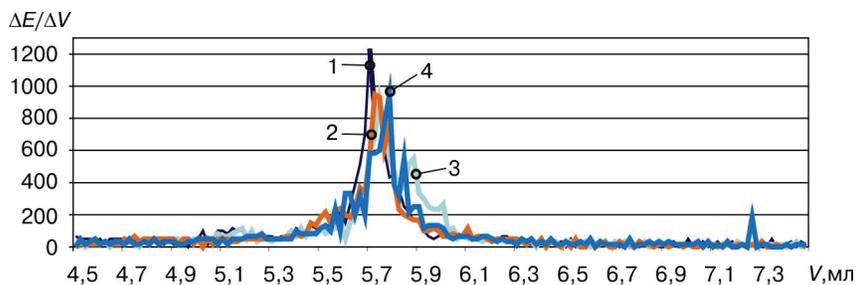


Рис. 2. Зависимость $\Delta E/\Delta V$ от объема 0,1 М раствора кислоты хлорной при титровании БАВ в исследуемых смесях протогенных растворителей:

- 1 — 15 мл CH_3COOH + 3 мл $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$; 2 — 15 мл CH_3COOH + 5 мл $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$;
3 — 10 мл CH_3COOH + 3 мл $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$; 4 — 10 мл CH_3COOH + 5 мл $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$;

На основании проведенных исследований разработана следующая методика ацидиметрического титрования:

Около 0,15 г (точная навеска) исследуемого вещества, предварительно высушенного до постоянной массы, растворяют в 15 мл уксусной кислоты безводной, прибавляют 3 мл раствора ацетата окисной ртути, 0,15 мл 0,1% раствора кристаллического фиолетового и титруют 0,1 М раствором кислоты хлорной до голубого окрашивания. Параллельно проводят контрольный опыт. 1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты соответствует 25,78 мг $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}_2 \cdot \text{HCl}$.

Для оценки пригодности предлагаемой аналитической методики проведена валидация по показателям: линейность результатов, воспроизводимость и точность в аналитической области методики [1, 2, 6]. Для валидационной оценки использовали выборки с нормальным распределением вариантов.

Для установления линейной зависимости осуществляли статистическую обработку выборки, полученной в результате количественного анализа 7 модельных проб на 7 уровнях концентрации в диапазоне 70—130% от количества исследуемого БАВ, принятого за 100% — 0,15 г. Регрессия эквивалентного объема титранта от содержания вещества строго линейна. Решающим аргументом в пользу этого служит рассчитанное значение коэффициента линейной корреляции, составляющее 1,0005. Следовательно, рассматриваемая зависимость выражается следующим уравнением прямой: $y = 38,59x + 0,0073$.

Оценка сходимости результатов осуществлялась путем статистической обработки выборок, полученных в ходе количественного анализа исследуемого вещества в модельных пробах на трех уровнях концентрации в пределах рекомендуемой аналитической области методики (80, 100, 120% от количества вещества, принятого за 100% — 0,15 г). Полученные результаты таковы:

1) уровень содержания исследуемого вещества 80%:

$$\bar{x} = 99,35; S = 0,070; S\bar{x} = 0,027; \Delta\bar{x} = 0,065; \bar{\varepsilon} = 0,06\%;$$

2) уровень содержания исследуемого вещества 100%:

$$\bar{x} = 99,46; S = 0,063; S\bar{x} = 0,024; \Delta\bar{x} = 0,058; \bar{\varepsilon} = 0,05\%;$$

3) уровень содержания исследуемого вещества 120%:

$$\bar{x} = 99,55; S = 0,026; S\bar{x} = 0,010; \Delta\bar{x} = 0,024; \bar{\varepsilon} = 0,002\%.$$

Результаты сравнения дисперсий трех полученных выборок по Фишеру свидетельствуют о статистической однородности последних. Следовательно, исследуемая методика валидна в рекомендуемой аналитической области.

Оценку воспроизводимости методики в рекомендованной аналитической области осуществляли на основании результатов статистической обработки выборок, полученных при количественном определении исследуемого вещества. Полученные данные титрования 3 серий (при $P = 95\%$, $n = 7$, $t(P,f) = 2,36$) следующие:

1) серия исследуемого вещества 050308:

$$\bar{x} = 99,68; S = 0,004; S\bar{x} = 0,007; \Delta\bar{x} = 0,003; \bar{\varepsilon} = 0,003\%;$$

2) серия исследуемого вещества 190908:

$$\bar{x} = 99,57; S = 0,018; S\bar{x} = 0,007; \Delta\bar{x} = 0,016; \bar{\varepsilon} = 0,016\%;$$

3) серия исследуемого вещества 011008:

$$\bar{x} = 99,86; S = 0,020; S\bar{x} = 0,008; \Delta\bar{x} = 0,018; \bar{\varepsilon} = 0,018\%.$$

Для однозначного подтверждения допустимости прямой экстраполяции установленных результатов валидации на исследуемую методику количественного анализа проведена непосредственная оценка воспроизводимости последней.

Представленные данные свидетельствуют о практически полной сходимости рассчитанного среднего содержания исследуемого вещества в субстанции (99,7%) с результатами микротитрования. Значение дисперсии, доверительного интервала и относительной погрешности результатов отражают высокую воспроизводимость методики.

Таким образом, результаты идентификации, растворимости и количественного определения целесообразно рекомендовать для включения в проект фармакопейной статьи на исследуемое БАВ.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Аладышева Ж.И.* Практические аспекты работ по валидации аналитических методик / Ж.И. Аладышева, В.В. Беляев, В.В. Береговых // *Фармация*. — 2008. — № 7. — С. 9—14.
- [2] *Беликов В.Г.* Валидационная оценка методики количественного определения триазо-прима / В.Г. Беликов, А.В. Бережной // *Фармация*. — 2005. — № 5. — С. 10—12.
- [3] Государственная фармакопея Российской Федерации. — М.: Изд-во и Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. — 704 с.: ил.
- [4] *Денеш И.* Титрование в неводных средах: перевод с англ. / И. Денеш. — М.: Мир, 1971. — 415 с.
- [5] *Непогодина Е.А.* Спектральные характеристики БАВ, производного ариоксиэтанамина // *Вестник Российского университета дружбы народов*. — 2008. — № 7. — С. 472—475.
- [6] Руководство ИСН «Валидация аналитических методик. Содержание и методология» Q2 (R1) // *Фармация*. — 2008. — № 4. — С. 3—10.
- [7] *Семеновых Е.В.* Влияние на артериальное давление новых трехзамещенных аминов / Е.В. Семеновых, А.Г. Томилов, А.В. Долженко // *Актуальные вопросы медицинской науки и здравоохранения: Материалы 60-й юбилейной науч.-практ. конф. молодых ученых и студентов [Тез. докл.]*. — Краснодар, 1999. — С. 63.

DEVELOPMENT OF WAYS OF IDENTIFICATION AND QUANTITATIVE DEFINITION NEW BAS, WICH SHOWS ANTIHYPERTENSIVE ACTIVITY

E.A. Nepogodina, L.A. Chekrishkina

Faculty of pharmaceutical chemistry additional education and extra-mural education
State Educational Establishment of Russian Federation
«the Perm state pharmaceutical academy of federal agency
on public health and social development»
Lenin's str., 48, Perm, Russia, 614990
tel. +79114636467, email: somvoz@live.ru

In the Perm state pharmaceutical academy new biologically active substance (BAS) — N-2(2'-methylphenoxy)-ethylmorpholine hydrochloride, shown high antihypertensive activity in test for cats is synthesized. The complex of researches have leads with the aim of development of ways of identification the method of quantitative definition in not water medium. Estimation validity of technique has bad on parameters: linearity of results, reproducibility and accuracy in analytical area of method. The results of our work have recommended for including in project pharmaceutical paper for investigated BAS.

Key words: identification derivative of aryloxyethaneamine, acid-base titration in not water medium, validity.