

РОЗРОБКА МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ОРИГІНАЛЬНОЇ СУБСТАНЦІЇ “ІНОКСАРИЛ”

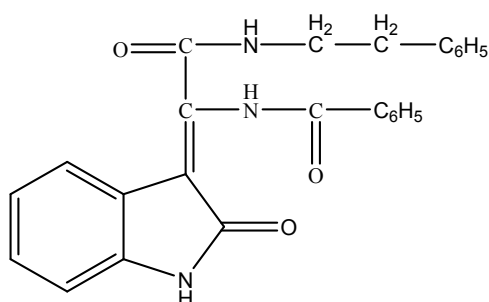
© С. В. Колісник

Національний фармацевтичний університет, Харків

Резюме: розроблено методики ідентифікації та кількісного визначення “Іноксарилу” – оригінальної субстанції з антигіпоксичною дією. Для ідентифікації іноксарилу відповідно до вимог ДФУ запропоновано використовувати ІЧ- та УФ-спектроскопію, тонкошарову хроматографію та хімічні реакції. Для кількісного визначення розроблено титриметричну методику (кислотно-основне титрування у неводному середовищі).

Ключові слова: фармацевтичний аналіз, ідентифікація, кількісне визначення, “Іноксарил”.

Вступ. Дані біологічних досліджень дозволили запропонувати до подальших доклінічних випробувань N-{2-оксо-1-(2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)-2-[(2-фенілетил)аміно]етил}-бензамід, який проявив в експерименті високу антигіпоксичну активність і є перспективним для застосування в медичній практиці [1–4].



Для впровадження лікарського засобу у виробництво необхідне проведення стандартизації діючої речовини в субстанції. Мета роботи – розробка методик ідентифікації та кількісного визначення N-{2-оксо-1-(2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)-2-[(2-фенілетил)аміно]етил} бензаміду („Іноксарилу”) для їх подальшого застосування в методах контролю якості на дану речовину.

Методи дослідження. Для ідентифікації “Іноксарилу” за вимогами Державної фармакопеї України використовували комплекс фізичних, хімічних та фізико-хімічних методів аналізу. Досліди проводились згідно з вимогами ДФУ щодо субстанцій [5, 6].

Для проведення досліджень використовували хроматографічно чистий зразок „Іноксарилу” (вміст домішок менше 0,5 %). У роботі застосовували мірний посуд класу А, реактиви, які відповідають вимогам ДФУ, аналітичні ваги “AXIS”, спектрофотометр «SPECORD 200», хроматографічні пластинки з шаром силікагелю GF₂₅₄.

ІЧ-спектр субстанції записано на приладі “Tensor 27” у таблетках KBr, концентрація речовини 1%.

Ідентифікація:

А. Інфрачервоний спектр поглинання речовини, одержаний у дисках із калію бромідом Р, має відповідати спектра стандартного зразка N-{2-оксо-1-(2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)-2-[(2-фенілетил)аміно]етил} бензаміду.

В. 50 мг речовини розчиняють у 96% спирті Р і доводять об’єм розчину тим самим розчинником до 50,0 см³. 1,0 см³ одержаного розчину доводять 96 % спиртом Р до об’єму 50,0 см³. Абсорбційний спектр досліджуваного розчину в ділянці від 220 до 450 нм повинен мати чотири максимуми: за довжин хвиль 249, 273, 278 та 339 нм. Відношення оптичної густини в максимумі за довжини хвилі 339 нм до оптичної густини в максимумі за довжини хвилі 278 нм має бути від 0,87 до 0,95.

С. Метод тонкошарової хроматографії.

Випробовуваний розчин. 0,050 г речовини розчиняють у спирті етиловому Р і доводять об’єм тим же розчинником до 10 см³. Розчин готують безпосередньо перед використанням.

Розчин порівняння (а). 0,050 г стандартного зразка N-{2-оксо-1-(2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)-2-[(2-фенілетил)аміно]етил} бензаміду розчиняють у спирті етиловому Р і доводять об’єм тим же розчинником до 10 см³. Розчин готують безпосередньо перед використанням.

Розчин порівняння (б). 1 см³ випробовуваного розчину (а) доводять спиртом етиловим Р до 50 см³.

На лінію старту хроматографічної пластинки “Silufol UV-254” наносять 10 мкл (200 мкг) випробовуваного розчину і 10 мкл (1 мкг) розчину порівняння. Пластинку поміщають у камеру із сумішшю розчинників хлороформ – спирт етиловий 96% – гексан (1:1:3). Коли фронт розчинників пройде 10 см від лінії старту, пластинку вийма-

ють із камери, висушують на повітрі та переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм.

На хроматограмі випробовуваного розчину будь-яка пляма, окрім основної, не має бути інтенсивнішою за пляму на хроматограмі розчину порівняння (0,5 %).

Придатність хроматографічної системи.

Хроматографічна система є придатною, якщо:

- R_f основної плями знаходиться близько 0,56;
- на хроматограмі 10 мкл (1 мкг) речовини чітко видна пляма.

Д. 0,05 г речовини розчиняють у 5 см³ спирту Р, додають 0,5 см³ 0,1 М розчину натрію гідроксиду; розчин набуває оранжево-жовтого забарвлення. Одержаний розчин ділять на дві частини і до однієї додають 0,1 см³ розчину міді сульфату Р, а до другої – 0,1 см³ розчину кобальту нітрату Р. Поступово у першому випадку спостерігається утворення осаду трав'янисто-зеленого кольору, у другому – осаду рожево-оранжевого кольору.

Кількісне визначення.

0,250 г досліджуваної речовини поміщають у колбу із притертою скляною пробкою, розчиняють у 25 см³ диметилформаміду Р і додають 0,05 см³ розчину 3 г/л тимолового синього Р у

метанолі Р. Одержаний розчин титрують 0,1 М розчином натрію метилату до коричнево-бурого забарвлення.

Паралельно проводять контрольний дослід. Виконують титрування до синього забарвлення розчину.

1 см³ 0,1 М розчину натрію метилату відповідає 41,15 мг C₂₅H₂₁N₃O₃, якого повинно бути від 99,0 до 101,0%.

Результати й обговорення. Наявність у структурі молекули досліджуваної речовини гетероциклічного та ароматичних циклів, а також спряжених подвійних зв'язків дозволяє використувати для її ідентифікації метод спектроскопії в ультрафіолетовій і видимій ділянках спектра. В абсорбційному спектрі 0,002 % етанольного розчину субстанції в ділянці від 220 до 450 нм спостерігається чотири максимуми поглинання при довжинах хвиль 249, 273, 278 та 339 нм і перегин смуги вбирання при 362 нм з наступним нахилом плато приблизно до 400 нм (рис. 1). Згідно з вимогами ДФУ, доцільно було розрахувати відношення величин оптичної густини при різній довжини хвиль. Встановлено, що відношення оптичної густини в максимумі при довжині хвилі 339 нм до оптичної густини в максимумі при 278 нм має бути від 0,87 до 0,95.

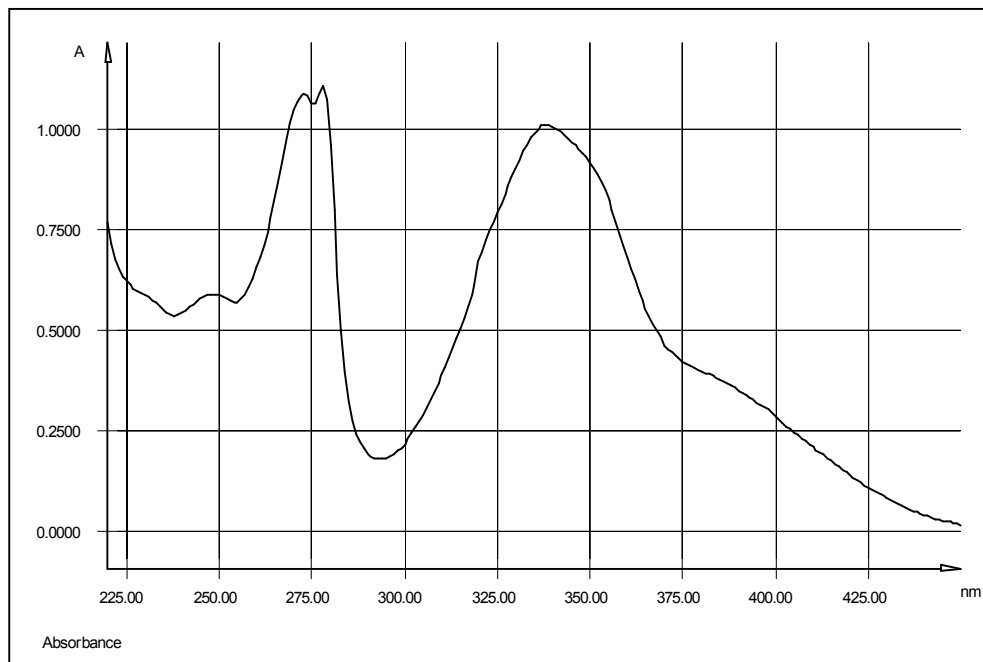


Рис. 1. Абсорбційний спектр 0,002 % етанольного розчину N-{2-оксо-1-(2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден)-2-[(2-фенілетил)аміно]етил}бензаміду.

Наявність лактам-лактимної таутомерії 2-оксоіндоліденового циклу N-{2-оксо-1-(2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден)-2-[(2-фенілетил)аміно]етил} бензаміду було підтверджено реакцією з розчином луку з утворенням оранжево-жовто-

го забарвлення. В абсорбційному спектрі розчину субстанції в 0,1 М розчині натрію гідроксиду спостерігається гіпсохромний зсув короткохвильових ароматичних смуг вбирання, які виводжуються у ряд перегинів смуги вбирання при

229, 267, 271 та 281 нм. У довгохвильовій ділянці відбувається батохромний зсув і зменшення інтенсивності максимуму, який у цьому випадку

розташовується при 344 нм, а також поява широкої низькоінтенсивної смуги вбирання з максимумом при 395 нм (рис. 2).

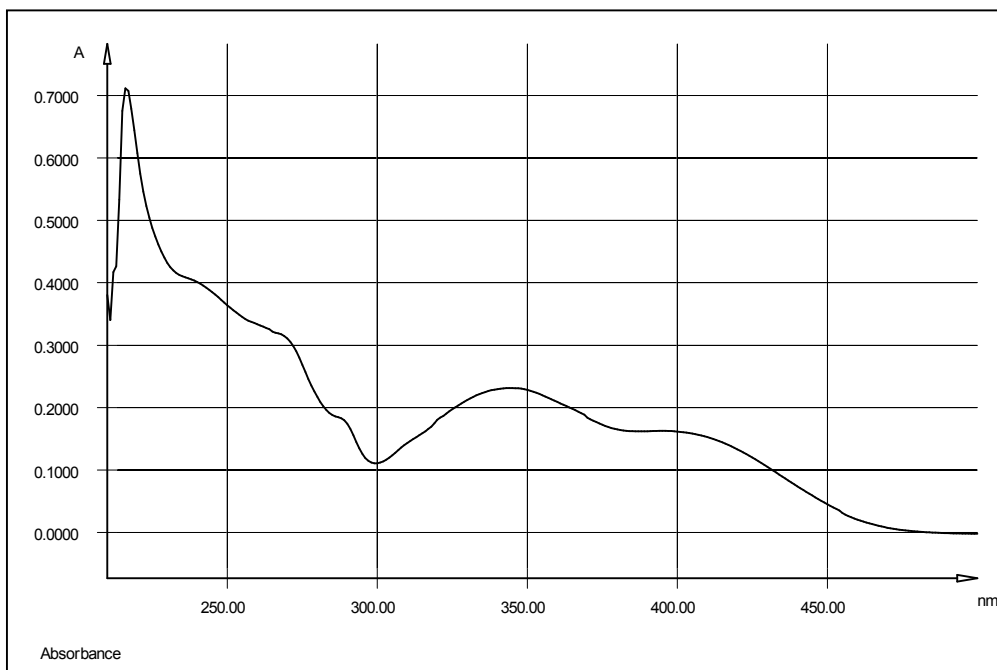


Рис. 2. Абсорбційний спектр 0,002 % розчину N-{2-оксо-1-(2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден)-2-[(2-фенілетил)аміно]етил}бензаміду в 0,1 М розчині натрію гідроксиду.

В ІЧ-спектрі “Іноксарилу” в діапазоні частот від 4000 до 400 cm^{-1} спостерігаються характерні смуги коливаль: у короткохвильовому діапазоні – декілька інтенсивних смуг при 3298, 3182 cm^{-1} , які відповідають валентним коливанням N-H зв'язків амідних груп [7]; при 1705 і 1656 cm^{-1} смуги, які відповідають валентним коливанням групи C=O (смуга амід I). При 1622 cm^{-1} розташована інтенсивна смуга, яка відповідає валентним коливанням C=C ароматичного кільця. Смугу при 1542 cm^{-1} можна віднести до деформаційних коливань зв'язку N-H амідних груп (смуга амід II). При 1478 і 1461 cm^{-1} спостерігаються досить інтенсивні смуги, які відповідають валентним зв'язкам ароматичних та гетероциклічних фрагментів молекули [8].

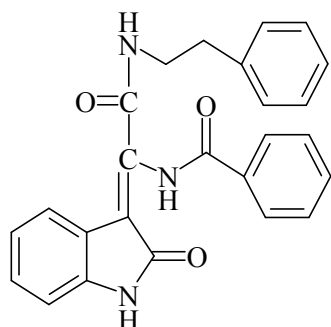
З огляду на будову N-{2-оксо-1-(2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден)-2-[(2-фенілетил)аміно]етил}бензаміду необхідно було довести наявність у молекулі 2-оксоіндолінового циклу [9]. Після додавання до спиртового розчину субстанції, який забарвлений у жовтий колір, 0,1 М розчину натрію гідроксиду відбувалось змінення його забарвлення на оранжево-жовте. При подальшому додаванні до нього розчинів солей важких металів спостерігалось утворення осадів: з розчином купруму (II) сульфату – трав'янисто-зеленого кольору, а з розчином кобальту нітрату – рожево-оранжевого.

Для ідентифікації та перевірки чистоти аналізованої субстанції використовували метод тонкошарової хроматографії на пластинках із шаром силікагелю GF₂₅₄ у системі розчинників хлороформ – спирт етиловий 96% – гексан (1:1:3). Хроматограми проявляли в УФ-світлі. На хроматограмі досліджуваного розчину спостерігали основну пляму, яка за розміром, забарвленням, інтенсивністю та розташуванням (R_f близько 0,56) відповідала плямі на хроматограмі розчину порівняння. Жодна додаткова пляма на хроматограмі досліджуваного розчину не перевищувала за розміром та інтенсивністю забарвлення пляму на хроматограмі розчину порівняння в (не більше 0,5 %).

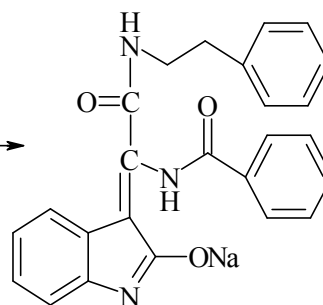
Грунтуючись на наявності лактам-лактімної таутомерії 2-оксоіндолінового циклу, для кількісного визначення досліджуваної субстанції можна передбачити можливість застосування кислотно-основного титрування.

За результатами досліджень метод алкаліметрії в спиртовому середовищі з потенціометричним фіксуванням кінцевої точки титрування призводив до занижених результатів. Відтворювані та близькі до номінального значення результати вдалося одержати, використовуючи кислотно-основне титрування у неводному середовищі. Наважку речовини розчиняли у ди-

метилформаміді, додавали розчин тимолового синього у метанолі та титрували 0,1 М розчином натрію метилату. Паралельно проводили контрольний дослід. Експериментально доведено,



що досліджувана речовина взаємодіє з натрію метилатом в еквімолярних кількостях. Механізм хімічного процесу, який при цьому відбувається, можна відобразити так:



Розрахунок кількісного вмісту діючої речовини проводили за формулою

$$\% = \frac{(V - V_{\text{к.д.}}) \cdot K \cdot T \cdot 100}{m_n},$$

де V – об'єм 0,1 М розчину натрію метилату, витрачений на титрування досліджуваної речовини, см^3 ;

$V_{\text{к.д.}}$ – об'єм 0,1 М розчину натрію метилату, витрачений на титрування контрольного дослідду, см^3 ;

K – коефіцієнт поправки до молярності 0,1 М розчину натрію метилату;

T – титр титранту за визначуваною речовиною;

m_n – маса наважки, г.

У таблиці 1 приведено одержані результати та метрологічні характеристики даного методу.

Таблиця 1. Результати кількісного визначення N-{2-оксо-1-(2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден)-2-[(2-фенілетил)аміно]етил}бензаміду методом кислотно-основного титрування у неводному середовищі

№ за/п	T , г/см ³	K 0,1М розчину CH_3ONa	m , г	Знайдено, %	Метрологічні характеристики середнього результату
1	0,04115	1,002	0,2522	99,77	$\bar{x} = 99,63$ $S^2 = 0,09759$ $S = 0,3124$ $S_r = 0,1276$ $\Delta x = 0,8032$ $\Delta \bar{x} = 0,3279$ $\varepsilon = 0,81\%$ $\bar{\varepsilon} = 0,33\%$
2			0,2498	99,08	
3			0,2505	99,62	
4			0,2517	99,97	
5			0,2487	99,51	
6			0,2500	99,82	

Висновки. 1. Розроблено методики ідентифікації нового потенційного лікарського засобу – “Іноксарилу”, які дозволяють повною мірою довести будову досліджуваної речовини.

2. Розроблено методику кількісного визначення “Іноксарилу” в субстанції методом кислотно-основного титрування у неводному середовищі.

Література

- Синтез и свойства N-[(1Z)-2-(алкиламино)-2-оксо-1-(2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)этил]бензамидов / С. В. Колесник, В. В. Болотов, А. А. Алтухов [та ін.] // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. – 2011. – Т. 6, № 1. – С. 114–118.
- Зв'язок “структура-антигіпоксична активність” у ряду похідних 2-бензамідо-2-(2-оксоіндолініліден-3)-оцтової кислоти / С. В. Колісник, Н. М. Кононенко,

Д. В. Гаман [та ін.] // Вісник фармації. – 2011. – № 4 (68). – С. 64 – 66.

3. Пат. 98852 Україна, МПК C07C 233/65, A61K 31/16, A61P 43/00. N-[(1Z)-2-оксо-1-(2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден)-2-[(2-фенілетил)аміно]етил]бензамід, що проявляє антигіпоксичну дію / Болотов В. В., Колісник С. В., Алтухов О. О., Кононенко Н. М., Гаман Д. В., Рибалкін М. В.; заявл. 04.10.2010; опубл. 25.06.2012,

Бюл. № 12.

4. Кононенко Н. М. Дія іноксарилу на стан периферійної крові щурів на моделі хронічної немічної гіпоксії / Н. М. Кононенко, Д. В. Гаман, М. В. Рибалкін // Фармацевтичний часопис. – 2011. – № 1. – С. 66–69.

5. Державна фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-ше вид. – Харків, 2001. – Доповнення 1. – 2004. – 520 с.

6. Державна Фармакопея України / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 1-ше вид. – Доповнення 4. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2011. – 540 с.

7. Беллами Л. Инфракрасные спектры сложных молекул / Л. Беллами. – М. : Издательство иностранной литературы, 1963. – 590 с.

8. Наканиси К. Инфракрасные спектры и строение органических соединений / К. Наканиси. – М. : Мир, 1965. – 216 с.

9. Мазор Л. Методы органического анализа / Л. Мазор; пер. с англ. – М. : Мир, 1986. – 584 с.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ОРИГИНАЛЬНОЙ СУБСТАНЦИИ “ИНОКСАРИЛ”

С. В. Колесник

Национальный фармацевтический университет, Харьков

Резюме: разработаны методики идентификации и количественного определения “Иноксарил” – оригинальной субстанции антигипоксического действия. Для идентификации иноксарилу в соответствии с требованиями ГФУ предложено использовать ИК- и УФ-спектроскопию, тонкослойную хроматографию и химические реакции. Для количественного определения разработана титриметрическая методика (кислотно-основное титрование в неводной среде).

Ключевые слова: фармацевтический анализ, идентификация, количественное определение, “Иноксарил”.

DEVELOPMENT OF QUALITY CONTROL TECHNIQUES FOR THE ORIGINAL SUBSTANCE INOXARYL

S. V. Kolisnyk

National University of Pharmacy, Kharkiv

Summary: the techniques of identification and quantification of Inoxyryl – the original substance with antihypoxant action were developed. For identification of INoxyryl in accordance with the requirements of the SPbU there was proposed to use IR- and UV-spectroscopy, thinlayer chromatography and chemical reactions. For the quantitative determination the titrimetric method (acid-base titration in non-aqueous medium) was developed.

Key words: pharmaceutical analysis, identification, quantification, Inoxyryl.