

Рекомендована д-м фармац. наук, проф. В. В. Петренком

УДК 54.061/.62 : 547.74

РОЗРОБКА МЕТОДИК СТАНДАРТИЗАЦІЇ 4-(2-МЕТИЛФЕНІЛ)АМІНО-1-ФЕНІЛ-1,5-ДИГІДРОПІРОЛ-2-ОНУ

© В. О. Зубков, С. Г. Таран, З. Г. Єрьоміна, О. В. Кізь, О. Л. Каменецька

Національний фармацевтичний університет, Харків

Резюме: досліджено спектральні характеристики та хімічні властивості потенційного НПЗЗ-4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону. Запропоновано методики ідентифікації та кількісного визначення цієї сполуки.

Ключові слова: 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-он, ідентифікація, кількісне визначення.

Вступ. Природні похідні 2,4-піролідіндіону привертають увагу вчених завдяки наявності широкого спектра біологічної дії: антибактеріальної, протівірусної, протилейкеміїної, протипухлинної та ін. [1-3]. З метою пошуку нових біологічно активних речовин подібної структури в Національному фармацевтичному університеті було одержано перспективну сполуку – 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-он (**I**), що проявляє виражені анальгетичний, протизапальний та антипіретичний ефекти при низькій токсичності [4-6]. Серед етапів впровадження нової субстанції в практичну медицину важливе місце посідає розробка стандартів її якості. Метою наших досліджень стала розробка методів ідентифікації та кількісного визначення, які б могли бути закладені в АНД на субстанцію сполуки **I**. Методи аналізу обирали з урахуванням вимог ДФУ та їх доступності і включають спектральні та хімічні дослідження [7].

Методи дослідження. Спектр ЯМР¹H записаний в ДМСО – D₆ на приладі Varian VXR – 300, робоча частота 300 МГц, внутрішній стандарт ТМС. ІЧ-спектр зареєстрований на спектрофотометрі "TENSOR-27" в області 4000-400 см⁻¹ у

таблетках з безводним бромідом калію (концентрація речовини складала 1%). Електронний спектр поглинання записаний на спектрофотометрі «Scan Cari 100 UV» в розчині етанолу (концентрація речовини складала 4,8·10⁻⁴%). Як стандартний зразок (СЗ) 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону (**I**) використовували зразок цієї речовини, багатократно підданий кристалізації, чистота та індивідуальність якого підтверджена комплексом інструментальних методів аналізу (РХ, ТШХ та спектри ЯМР¹H).

Методика приготування стандартних розчинів для визначення питомого показника поглинання: 0,060 г досліджуваної речовини поміщають у мірну колбу місткістю 200 мл, розчиняють при нагріванні у 80 мл етанолу Р, охолоджують, доводять об'єм розчину етанолом Р до позначки і перемішують. 10 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм розчину етанолом Р до позначки і перемішують (розчин а). Стандартні розчини 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону (**I**) №1-11 готували розведенням етанолом відповідної кількості розчину а (табл. 1) до 10 мл.

Таблиця 1. Результати визначення питомого показника поглинання ($A_{1cm}^{1\%}$) 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону (**I**) при $\lambda=306$ нм

№ за/п	Кількість, мл розчину а	Концентрація стандартного розчину, (с,%)	A	$A_{1cm}^{1\%}$
1	0,8	$2,4 \cdot 10^{-4}$	0,2304	960
2	1,0	$3,0 \cdot 10^{-4}$	0,2905	968
3	1,2	$3,6 \cdot 10^{-4}$	0,3420	950
4	1,4	$4,2 \cdot 10^{-4}$	0,4077	971
5	1,6	$4,8 \cdot 10^{-4}$	0,4647	968
6	1,8	$5,4 \cdot 10^{-4}$	0,5211	965
7	2,0	$6,0 \cdot 10^{-4}$	0,5820	970
8	2,2	$6,6 \cdot 10^{-4}$	0,6349	962
9	2,4	$7,2 \cdot 10^{-4}$	0,6977	969
10	2,6	$7,8 \cdot 10^{-4}$	0,7426	952
11	2,8	$8,4 \cdot 10^{-4}$	0,8022	955

Результати й обговорення. За зовнішнім виглядом 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-он (I) – білі або білі з жовтуватим відтінком кристали, без запаху; розчинні у ДМФА, ДМСО, дуже малорозчинні в етанолі, практично нерозчинні у воді.

Як видно з рисунка 1, в спектрі ЯМР ^1H (ДМСО – D_6) присутні сигнали: NH-групи (8,72 м.ч., синг-

лет), ароматичних протонів (7,67-6,94 м.ч., мультиплет), протона у положенні С-3 (4,89 м.ч., синглет) та метиленової групи пірольного кільця (4,56 м.д., синглет), метильна група о-толуїдину (2,25 м.ч., синглет), що підтверджує структуру 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону (I) та свідчить про певний рівень його індивідуальності.

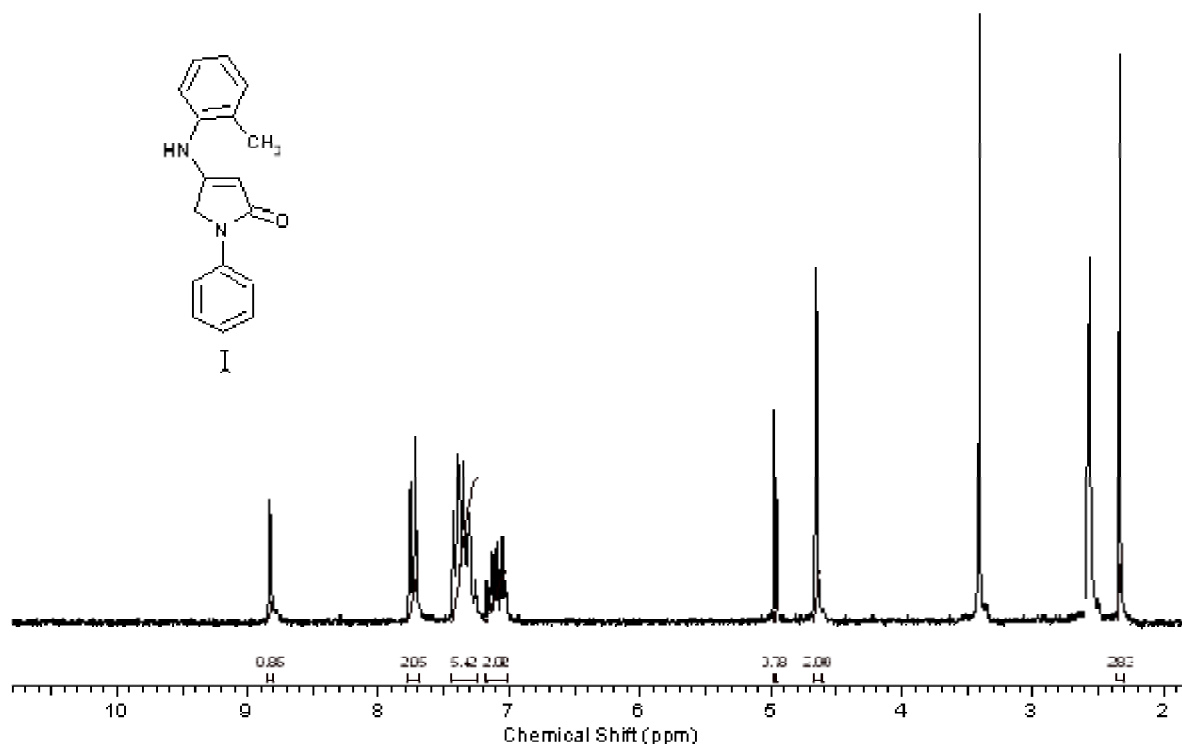


Рис. 1. Спектр ЯМР ^1H 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону (I) в ДМСО- D_6 .

^1H -спектр досліджуваного 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону (I) (попередньо висушеного до сталої маси) в таблетках калію броміду характеризується наявністю відповідних смуг поглинання (рис. 2): смуга поглинання сильної інтенсивності в області 1645 cm^{-1} , що відповідає валентним коливанням карбонілу в положенні 2 ($\nu\text{ C=O}$, амід I); воднево зв'язана смуга деформаційних коливань вторинної аміногрупи середньої інтенсивності при 3220 cm^{-1} ($\delta\text{ NH}$); при 3060 cm^{-1} спостерігається середньої інтенсивності смуга валентних коливань CH ($\nu\text{ CH}$) ароматичного радикала; на ділянці $1615\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ присутні смуги середньої та сильної інтенсивності, зумовлені коливаннями ароматичного кільця; валентні коливання CH -угруповання алкенового фрагмента ($\text{RR}'\text{C}=\text{CHR}^2$) проявляються у вигляді плеча при 3040 cm^{-1} ; на ділянці $1470\text{--}1435\text{ cm}^{-1}$ спостерігаються середньої інтенсивності смуги, що відповідають деформаційним

коливанням: $\delta_{\text{as}}\text{ CH}_3$ і $\delta\text{ CH}_2$; смуга симетричних коливань $\delta_{\text{s}}\text{ CH}_3$ проявляється в області 1380 cm^{-1} ; на ділянці спектра від 2920 до 2845 cm^{-1} спостерігаються смуги, спричинені валентними асиметричними та симетричними коливаннями метиленового угруповання.

Враховуючи, що ДФУ [7] рекомендує використовувати метод ^1H -спектроскопії для ідентифікації субстанцій, ми рекомендуємо відповідний тест так:

*Інфрачервоний спектр поглинання (2.2.24)*субстанції, одержаний у дисках, має відповідати спектру СЗ 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону.*

Що стосується електронного спектра поглинання 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону (I) в етанолі (рис.3), то він характеризується наявністю двох максимумів поглинання: високоінтенсивного максимуму при 306 nm та малоінтенсивного – при 233 nm .

* – тут і далі – посилання на відповідний розділ ДФУ.

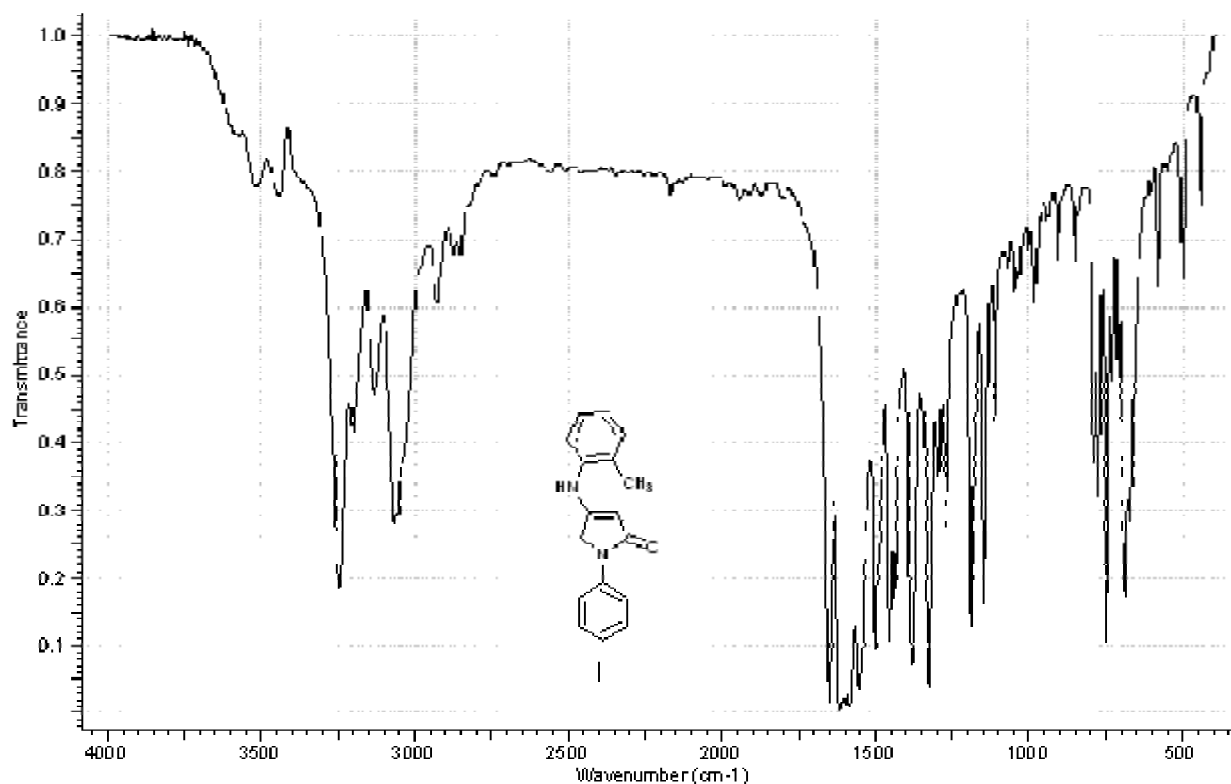


Рис. 2. ІЧ-спектр поглинання 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону (I)

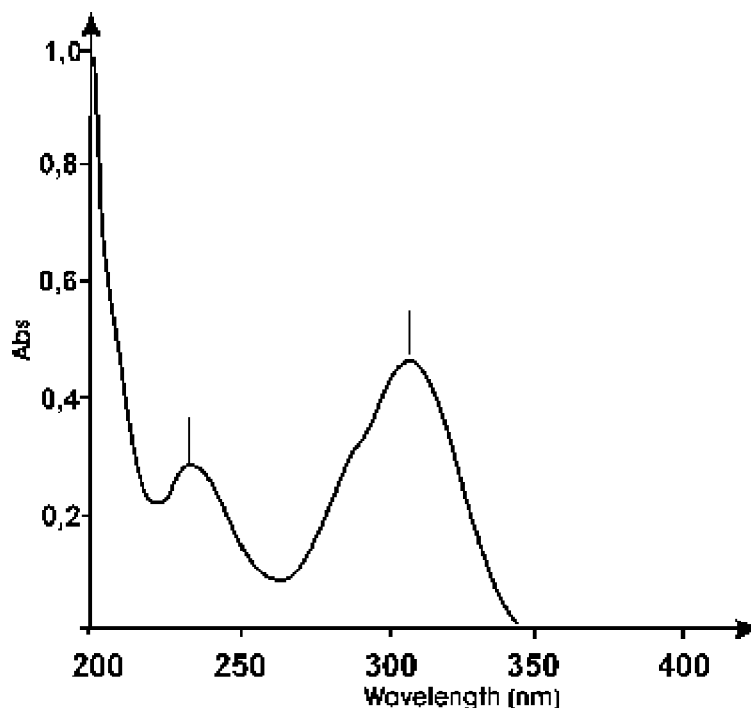


Рис. 3. Електронний спектр поглинання 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону (I) в етанолі.

З цих двох смуг як аналітична може бути обрана смуга поглинання з максимумом при (306 ± 2) нм, оскільки вона характеризується достатньою інтенсивністю та шириною. Для подаль-

ших аналітичних досліджень необхідно було визначити питомий показник поглинання за вказаної довжини хвилі. З цією метою було приготовано серію стандартних розчинів випробу-

вуваної речовини, виміряно їх оптичну густину та побудовано градувальний графік залеж-

ності оптичної густини розчину від його концентрації (рис. 4).

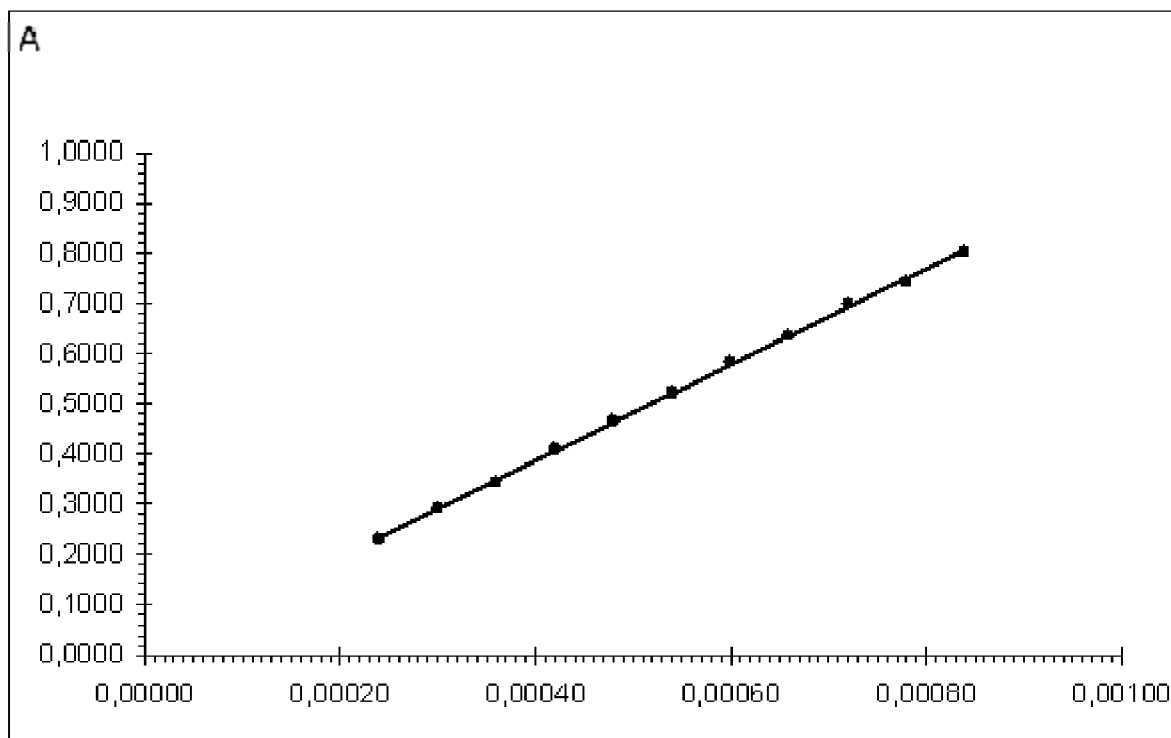


Рис. 4. Графік залежності оптичної густини від концентрації 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону (I).

Як видно з рисунка 4, графік протягом всієї довжини має вигляд прямої, що свідчить про підпорядкування розчинів 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону (I) закону Бугера-Ламберта-Бера в межах всіх досліджуваних концентрацій: $2,4 \cdot 10^{-4}$ – $8,4 \cdot 10^{-4}\%$.

Тому всі одержані значення A використовували для обчислення питомого показника поглинання, яке проводили за формулою:

$$A_{1\text{см}}^{1\%} = \frac{A}{b \cdot c}, \quad \text{де } A_{1\text{см}}^{1\%} - \text{питомий показник}$$

поглинання;

A – оптична густина розчину;

c – концентрація речовини в розчині (%);

b – довжина оптичного шляху (см), тобто товщина шару кювети.

Результати визначення наведено в таблиці 1.

Отримані результати були піддані статистичній обробці (табл. 2).

Таким чином, за результатами УФ-спектральних досліджень 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону (I), для включення в проект АНД рекомендовано тест на ідентифікацію такой:

0,060 г досліджуваної речовини поміщують у мірну колбу місткістю 200 мл, розчиняють при нагріванні у 80 мл етанолу Р, охолоджують, доводять об'єм розчину етанолом Р до позначки і перемішують. 10 мл отриманого розчину поміщують у мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм розчину етанолом Р до позначки і перемішують (розчин а).

1,5 мл отриманого розчину поміщують у мірну колбу місткістю 10 мл, доводять об'єм розчину етанолом Р до позначки і перемішують (розчин в).

Оптичну густину отриманого розчину вимірюють при довжині хвилі 306 нм у кюветі з товщиною шару 1 см, використовуючи як розчин порівняння етанол Р. Ультрафіолетовий спектр

Таблиця 2. Метрологічні характеристики середнього результату визначення питомого показника поглинання ($A_{1\text{см}}^{1\%}$) 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону

v	\bar{x}	S^2	S	$S_{\bar{x}}$	P	t(P, v)	Δx	$\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$	\bar{e}
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
10	963	521,1	22,8	6,87	95	2,2281	50,80	963±15,30	1,59

поглинання (2.2.25) одержаного розчину повинен мати два максимуми за довжини хвиль (233±2) нм і (306±2) нм. Питомий показник поглинання в максимумі за довжини хвилі 306 нм має бути від 948 до 978.

Наступним етапом нашого дослідження була розробка методики спектрофотометричного кількісного визначення 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону (I).

Метод стандарту при проведенні спектрофотометричного кількісного визначення в загаль-

ному випадку є більш надійним, оскільки дозволяє знівелювати помилку приладу. Вимірювали оптичну густину розчину **В**, приготованого за методикою ідентифікації, наведеною вище, а також розчину порівняння, приготованого аналогічним чином із використанням 0,060 г СЗ 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону (I).

Вміст 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону (I) (x,%), розраховували за формулою :

$$x, \% = \frac{A_x \cdot m_0 \cdot 10 \cdot 1,5 \cdot 10 \cdot 100 \cdot 200 \cdot 100}{A_0 \cdot 200 \cdot 100 \cdot 10 \cdot 1,5 \cdot 10 \cdot m_n} = \frac{A_x \cdot m_0 \cdot 100}{A_0 \cdot m_n},$$

де A_x – оптична густина розчину **В** досліджуваної речовини ;

A_0 – оптична густина розчину **В** СЗ 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону;

m_0 – маса наважки СЗ 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону, г;

m_n – маса наважки досліджуваної речовини 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону (I), г.

Результати визначення відсоткового вмісту 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону (I) методом стандарту наведені у таблиці 3.

Метрологічні характеристики [8-10] результатів визначення відсоткового вмісту 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону (I) наведені у таблиці 4.

Як видно з результатів статистичної обробки, значення відносної невизначеності окремого

Таблиця 3. Результати визначення відсоткового вмісту 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону (I) з використанням МС

№ за/п	m_n , г	m_0 , г	A_0	A_x	Найдено x, %
1	2	3	4	5	6
1	0,06032	0,0600	0,4372	0,4364	99,3
2	0,05988			0,4306	98,7
3	0,05914			0,4313	100,1
4	0,06024			0,4310	98,2
5	0,06018			0,4324	98,6
6	0,05964			0,4359	100,3

Таблиця 4. Метрологічні характеристики результату визначення вмісту 4-(2-метилфеніл)аміно 1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону (I)

m	n	ν	\bar{x}	S	$S_{\bar{x}}$	P	$t(P, \nu)$	Dx	$D\bar{x}$	ε	\bar{e}
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
100	6	5	99,2	0,8532	0,348	95	2,5706	2,09	0,85	2,11	0,86

визначення є завеликим ($\varepsilon=2,11\%$) для того, щоб цю методику вважати вдалою для кількісного визначення субстанції. Тому розроблену методику УФ-спектрофотометричного визначення 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону (I) з використанням методу стандарту ми рекомендуємо для застосування в аналізі лікарських форм цієї субстанції.

Вивчаючи можливості застосування хімічних реакцій для ідентифікації 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону (I), ми виходили з особливостей реакційної здатності цієї сполу-

ки, пов'язаної з наявністю активного СН угруповання єнамінового фрагмента. Тому як можливі реакції ідентифікації сполуки I було апробовано низку кольорових реакцій [11,12].

Результати проведення експерименту з використанням відповідних реактивів наведено в таблиці 5.

Для внесення до розділу "Ідентифікація" проекту АНД, як найбільш показові, ми рекомендуємо такі тести :

1) до близько 2 мг субстанції додають 1 краплю кислоти сірчаної Р і 1 краплю кислоти азот-

Таблиця 5. Реакції ідентифікації 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону (I)

№ за/п	Реактив	Спостереження
1	2	3
1	Кислота сірчана Р	Жовте забарвлення, яке підсилюється при нагріванні на водяній бані
2	Кислота азотна Р	Яскраво-жовте забарвлення
3	Кислота сірчана Р – кислота азотна Р (1:1)	Фіолетове забарвлення, яке з часом переходить в вишнево-червоне
4	Кислота сірчана Р (3 мл) Натрію нітрит 0,02 г	При нагріванні на водяній бані з'являється червоно-коричнє забарвлення
5	Розчин формальдегіду Р в кислоті сірчаній Р	При нагріванні на водяній бані з'являється фіолетове забарвлення
6	20% розчин η-диметиламінобензальдегіду в кислоті сірчаній Р	Жовто-оранжеве забарвлення, яке з часом переходить в червоно-коричнє
7	20% розчин η-диметиламінобензальдегіду в кислоті сірчаній Р з додаванням кислоти оцтової льодяної Р	Яскраво-жовте забарвлення, яке при додаванні води переходить у червоно-фіолетове

ної Р; з'являється фіолетове забарвлення, яке з часом переходить у вишнево-червоне;

2) до близько 2 мг субстанції додають 1 мл 20 % розчину η-диметиламінобензальдегіду в кислоті сірчаній Р і 1 краплю кислоти оцтової льодяної Р; з'являється яскраво-жовте забарвлення, яке переходить у червоно-фіолетове при додаванні 1 мл води Р.

Висновки. 1. Проведено дослідження фізичних та хімічних характеристик потенційного НПЗЗ – 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону.

2. Запропоновано методики ідентифікації 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону методами ІЧ-, УФ- спектрофотометрії та хімічними.

3. Для визначення кількісного вмісту 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-ону в лікарських формах запропоновано УФ-спектрофотометричну методику.

4. Запропоновані аналітичні методики ідентифікації та кількісного вмісту можуть бути використані при розробці АНД на перспективний НПЗЗ - 4-(2-метилфеніл)аміно-1-феніл-1,5-дигідропірол-2-он.

Література

1. A new pyrrolidine-2,4-dione derivative, vermehotin, isolated from unidentified fungus IFM 52672 / H. Tomoo, F. Kazutaka, T. Kayoko [et al.] // Heterocycles. – 2006. – Vol. 68, №9. – P. 1949–1953.
2. Isolation and structure elucidation of vancoresmycin – a new antibiotic from *Amycolatopsis* sp. ST 101170 / C. Hopmann, M. Kurz, M. Bronstrup [et al.] // Tetrahedron Letters. – 2002. – Vol. 43, №3. – P. 435–438.
3. Phytotoxicity of the tetramic acid metabolite trichosetin / E.C. Marfori, S-i. Kajiyama, E-i. Fukusaki, A. Kobayashi / Phytochemistry. – 2003. – Vol. 62, №5. – P.715–721.
4. Синтез та анальгетична активність 1-феніл-4-R-аміно-1,5-дигідропірол-2-онів / [В.О. Зубков, С.Г. Таран, Л. В. Яковлева, О.В. Кізь, Г. Л. Литвиненко] // Фармацевтичний часопис. – 2009. – № 4(9). – С. 6–9.
5. Пат. 35938 У Україна, МПК C07D 207/00 A61K 31/40. 1-Феніл-4-о-толіламіно-1,5-дигідропірол-2-он, який проявляє антиоксидантну активність / Зубков В. О., Таран С.Г., Кізь О.В., Вороніна Л.В., Стрельченко К.В., Красільникова О.А. ; заявник і власник патенту Національний фармацевтичний університет. – № у 2008 05673 ; заявл. 30.04.2008 ; опубл. 10.10.2008, Бюл. № 19.
6. Пат. 357414 У Україна, МПК C07D 207/00 A61K 31/40.

- 1-Феніл-4-о-толіламіно-1,5-дигідропірол-2-он, який проявляє анальгетичну та протизапальну активність / Зубков В.О., Таран С.Г., Гриценко І.С., Кізь О.В., Яковлева Л.В., Шаповал О.М., Литвиненко Г.Л., заявник і власник патенту Національний фармацевтичний університет. – № у 2008 05676 ; заявл. 30.04.2008 ; опубл. 10.11.2008. Бюл. № 21.
7. Державна фармакопея України / Держ. п-во „Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-ше вид. – Х.: Реріг, 2001. – 556 с.
8. Державна фармакопея України / Держ. п-во „Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-ше вид., допов. 1. – Х.: Реріг, 2004. – 520 с.
9. Гризодуб А. И. Валидация спектрофотометрических методов количественного анализа лекарственных средств в соответствии с требованиями ГФУ / А.И. Гризодуб // Фармаком. – 2002. – № 3. – С. 42–50.
10. Гризодуб А. И. Стандартные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств / А.И. Гризодуб // Фармаком. – 2006. – № 1/2. – С. 35–44.
11. Егорова А.Ю. Зн-Пиррол-2-оны. Синтез и реакции: учебное пособие / А.Ю. Егорова, З.Ю. Тимофеева. – Издательство: «Промышленность Поволжья», 2003. – 350 с.

12. Солдатенков А.Т. Основы органической химии лекарственных веществ / А.Т. Солдатенков, Н.М. Колядина, И.В. Шендрик. – М.: Химия, 2001.– 1920 с.

РОЗРАБОТКА МЕТОДИК СТАНДАРТИЗАЦІЇ 4-(2-МЕТИЛФЕНІЛ)АМІНО-1-ФЕНІЛ-1,5-ДИГИДРОПІРРОЛ-2-ОНА

В. А. Зубков, С. Г. Таран, З. Г. Еремина, О. В. Кизь, О. Л. Каменецкая

Национальный фармацевтический университет, Харьков

Резюме: исследованы спектральные характеристики и химические свойства потенциального НПВС-4-(2-метилфенил)амино-1-фенил-1,5-дигидропирирол-2-она. Предложены методики идентификации и количественного определения данного соединения.

Ключевые слова: 4-(2-метилфенил)амино-1-фенил-1,5-дигидропирирол-2-он, идентификация, количественное определение.

THE METHODS OF STANDARDIZATION OF 4-(2-METHYLPHENYL)AMINO-1-PHENYL-1, 5-DI-HYDROPIRROL-2-ONE.

V. O. Zubkov, S. H. Taran, Z. H. Yeriomina, O. V. Kiz, O. L. Kamenetska

National Pharmaceutical University, Kharkiv

Summary: the spectral characteristics and chemical properties of 4 (2-methylphenyl)amino-1-phenyl-1,5-dihydropyrrol-2-one as the potential of NSAIDs substance have been investigated. The methods of identification and assay of this compound have been elaborated and proposed.

Key words: 4 (2-methylphenyl)amino-1-phenyl-1,5-dihydropyrrol-2-one, identification, quantification.

Рекомендована д-м фармац. наук, проф. В. В. Петренко

УДК 543.42+535.24:547.96-615.451+615.453.6

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ГЛІЦИНУ У ТАБЛЕТКАХ, ЩО МІСТЯТЬ ГЛІЦИН ТА ДЕЯКІ РОСЛИННІ ЕКСТРАКТИ

© **Л. С. Логойда, Л. В. Вронська, А. Є. Демид, М. М. Михалків**

Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського

Резюме: розроблено методику кількісного визначення гліцину у таблетках, що містять гліцин та деякі рослинні екстракти. Вивчено основні валідаційні характеристики методики, в основі якої лежить реакція взаємодії гліцину з нінгідрином.

Ключові слова: гліцин, нінгідрин, кількісне визначення, валідаційні характеристики.

Вступ. При розробці складу та технології нових лікарських засобів, незалежно від виду лікарської форми, технологую необхідні методи контролю вмісту речовин, які є активними

фармацевтичними інгредієнтами. Нами розроблений склад та технологія таблеток стреспротекторної дії на основі деяких рослинних екстрактів та гліцину [1]. Для контролю вмісту гліци-