

А.Г. Каплаушенко, О.І. Панасенко, Є.Г. Книш, С.О. Васюк, О.О. Тарханова

РОЗРОБКА МЕТОДІВ ЯКІСНОГО ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ МОРФОЛІНІЙ 2-(5-(4-ПІРИДИЛ)-4-(2-МЕТОКСИФЕНІЛ)-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ІЛТІО)АЦЕТАТУ

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: 1,2,4-тріазоли, методи аналізу.

Ключевые слова: 1,2,4-триазолы, методы анализа.

Key words: 1,2,4-triazols, analysis methods.

Розроблено методи якісного та кількісного визначення субстанції морфоліній 2-(5-(4-піридил)-4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтїо)ацетату, а також його 1% і 2,5% водних розчинів.

Разработаны методы качественного и количественного определения морфолиний 2-(5-(4-пиридил)-4-(2-метоксифенил)-1,2,4-триазол-3-илтио)ацетата, а также его в 1% и 2,5% водных растворах.

We have developed the methods of qualitative and quantitative definition of morpholinii 2-(5-(4-pyridil)-4-(2-methoksiphenil)-1,2,4-triazol-3-iltio)acetat in 1 % and 2,5 % aqueous solutions.

Лікування екстремальних кисневодефіцитних станів та захворювань гіпоксичного генезу, що може бути виклаикано складними умовами праці на підприємствах, зокрема вугільної, хімічної промисловості, а також в металургійній галузі, де мають місце підвищена температура та зниження рівня кисню у повітрі робочої зони є дуже важливим завданням фармацевтичної науки.

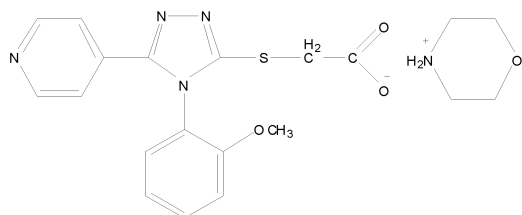
Цілеспрямований синтез речовин на основі гетероциклів [6-8], зокрема похідних 1,2,4-тріазолу дозволив знайти речовини, які мають дуже низьку токсичність [1], високі показники антиоксидантної активності [4] та антигіпоксичної дії з термопротекторними властивостями [5]. Деякі з вищевказаних речовин, як наприклад морфоліній 2-(5-(4-піридил)-4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтїо)ацетат, є досить технологічними в отриманні [3] і можуть знайти своє застосування як оригінальні лікарські засоби.

МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ – розробка методів якісного і кількісного аналізу морфоліній 2-(5-(4-піридил)-4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтїо)ацетату з метою розробки проекту аналітичної нормативної документації.

Робота виконувалась спільно зі співробітниками фізико-хімічного відділу ЦНДЛ Запорізького державного медичного університету.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Об'єкт дослідження: морфоліній 2-(5-(4-піридил)-4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтїо)ацетат.



Зовнішній вигляд: субстанція відповідає вимогам тесту, якщо має наступний зовнішній вигляд – жовтий кристалічний порошок, розчинний в воді, етанолі, малорозчинний в ацетоні і ефірі.

Кристалічність.

Апаратура: Поляризаційний мікроскоп, мінеральне масло, скляна пластинка.

Процедура. Помістити декілька часток зразка в міне-

ральне масло на чистій скляній пластинці. Досліджувати приготувану суміш за допомогою поляризаційного мікроскопа.

Якщо частка показує подвійне променезаломлення в положенні, коли обертається столик мікроскопа, то зразок є кристалічним.

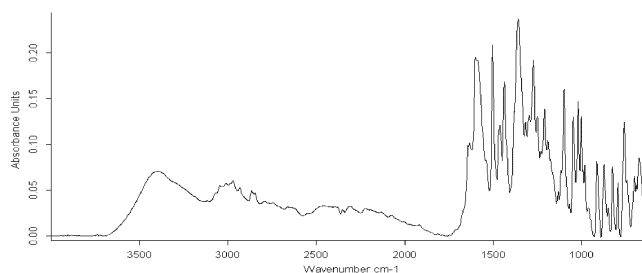
Ідентифікація

Температура плавлення морфолінію 2-(5-(4-піридил)-4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіо)ацетата має відповідати робочому зразку. Температуру плавлення визначили за [2] капілярним способом (2.2.14) на приладі ПТП (М) [3].

ІЧ-спектроскопія:

Апаратура: спектрофотометр Specord M-80.

Близько 5 мг робочого стандартного зразку, висушеного до постійної маси при температурі 65°C розтирають з 300-400 мг калій броміду. Записують ІЧ-спектр зразка в межах від 4000 до 300 см⁻¹. Інфрачервоний спектр поглинання субстанції має чіткі максимуми при таких саме хвильових числах, як і препарат робочого стандартного зразка (мал. 1).



Малюнок 1. Інфрачервоний спектр поглинання морфоліній 2-(5-(4-піридил)-4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтїо)ацетату

Якісні реакції на субстанцію, або 1% чи 2,5% водний розчин морфоліній 2-(5-(4-піридил)-4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіо)ацетату:

1. 0,1 г морфоліній 2-(5-(4-піридил)-4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіо)ацетату поміщають у пробірку, додають 1 мл води очищеної і нагрівають над полум'ям газового пальника до кипіння. Вологий червоний лакмусовий папір, піднесений до отвору пробірки, синіє (морфолін).

2. При подальшому нагріванні папір, змочений розчи-

ном плюмбум (II) ацетату Р, піднесений до отвору пробірки, буріє (сірка).

3. Близько 0,1 г морфоліній 2-(5-(4-піридил)4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіо)ацетата (або 10 мл 1% розчину випаровують і висушують) поміщають у пробірку, додають близько 0,1 г диметиламінобензальдегіду Р, 2 мл суміші оцтового ангідриду Р і ацетатної кислоти Р (1:1), нагрівають при слабкому кипінні над полум'ям газового пальника 1-2 хвилини, рідина забарвлюється в яскраво-сунічний колір (2-(5-(4-піридил)4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіо)ацетатна кислота).

4. В пробірку поміщають 0,1 г морфоліній 2-(5-(4-піридил)4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіо)ацетата, додають 1 мл води очищеної, 1 мл розчину купрум (II) сульфату, випадає осад світло блакитного кольору (морфоліній 2-(5-(4-піридил)4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіо)ацетат).

5. В пробірку поміщають 0,1 г морфоліній 2-(5-(4-піридил)4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіо)ацетата, додають 1 мл води очищеної, 1 мл розчину ферум (III) хлориду, випадає осад жовтуватого кольору (морфоліній 2-(5-(4-піридил)4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіо)ацетат).

6. В пробірку поміщають 0,1 г морфоліній 2-(5-(4-піридил)4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіо)ацетату, додають 1 мл води очищеної 1 мл реактиву Бушарда, випадає осад коричневого кольору (морфоліній 2-(5-(4-піридил)4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіо)ацетат).

Аналогічні реакції характерні також для 1% і 2,5% водних розчинів субстанції, що вивчається.

Кількісне визначення основної речовини та супутніх домішок в субстанції морфоліній 2-(5-(4-піридил)4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіо)ацетату.

Апаратура: ВЕРХ, що складається з насоса, УФ-детектора, типового інжектора, і інтегратора або еквівалентного програмного забезпечення. Система обладнана УМС - TMS, 4,6 x 250 мм, 5 мкм або еквівалентна.

Реактиви: Метанол ВЕРХ, амоній дигідроортофосфат AR, ортофосфорна кислота AR, Ацетанілід ВЕРХ, вода ВЕРХ або аналогічна.

Хроматографічна система: колонка: УМС - TMS, 4,6 x 250 мм, 5 мкм або еквівалентна. Довжина хвилі: 278 нм. Швидкість рухомої фази: 1,0 мл/хв. Об'єм ін'єкції: 10 мкл. Температура колонки: 35°C. Керований час: 30 хв.

Процедура: ввести розчин зразка двічі в хроматограф, записати хроматограми. Ввести стандартний розчин двічі в хроматограф і записати хроматограми. Для обчислення використовують середню площу стандартного розчину. Розрахунок проводять за формулою:

$$X(\%) = \frac{At \times Wstd \times P \times 100}{As \times Wt \times (100 - W)}$$

де
X (%) – безводна речовина
At – середня площа внутрішнього стандарту для двох ін'єкцій зразка;
As – сума площ 5-(4-піридил)4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-

тріазол-3-тіону (як можливої домішки) і морфолінію 2-(5-(4-піридил)4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтію)-ацетату для двох ін'єкцій стандарту;

Wstd – вага стандарту (міліграм);

Wt – вага зразка (міліграм);

P – чистота стандартного зразка (%);

W – вода, %.

Кількісне визначення морфоліній 2-(5-(4-піридил)4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтію)-ацетату

Аліквоту водного розчину морфоліній 2-(5-(4-піридил)4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтію)-ацетату (0,3-0,9 мг) вміщують в мірну колбу ємністю 25,00 мл, доводять водою дистильованою до позначки, перемішують. Вимірюють оптичну густину при 275 нм на фоні компенсаційного розчину (води дистильованої).

Кількісне визначення морфоліній 2-(5-(4-піридил)4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтію)-ацетату в 1% та 2,5% розчинах

Аналітичне обладнання. Спектри поглинання реєстрували за допомогою спектрофотомету SPECORD 200 в ультрафіолетовій області спектру з використанням прямокутних кварцевих кювет з товщиною шару 1 см. Обробку одержаних спектрів проводили за допомогою програмного пакету WinASPECT 2.2.1.0. Наважки брали за допомогою аналітичних терезів KERN ABT 120-5DM.

Методика проведення експерименту: 2,50 мл 1% (або 1,00 мл 2,5%) розчину морфоліній 2-(5-(4-піридил)4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтію)-ацетату вміщують в мірну колбу на 100,0 мл, доводять водою дистильованою до позначки, перемішують. 2,00 мл одержаного розчину вміщують в мірну колбу ємністю 25,00 мл, доводять водою дистильованою до позначки, перемішують. Вимірюють оптичну густину при 275 нм на фоні компенсаційного розчину (води дистильованої). Визначення проводять методом стандарту. В якості розчину порівняння використовували 2,00 мл 0,025% розчину морфоліній 2-(5-(4-піридил)4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтію)-ацетату. Розрахунок відсоткового вмісту проводять за формулою:

$$C_{\%} = \frac{A \cdot C_0 \cdot 100 \cdot 25}{A_0 \cdot p \cdot 2}$$

де

A – оптична густина досліджуваного розчину,

A₀ – оптична густина розчину порівняння,

C₀ – концентрація розчину порівняння, який спектрофотометрують (0,002 г/100 мл),

p – наважка, мл,

l – товщина шару, см.

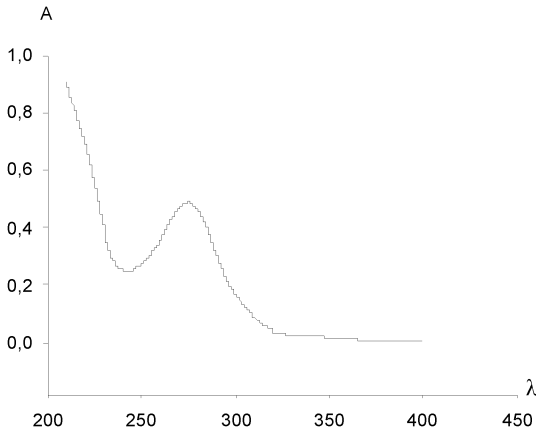
Для кількісного визначення досліджуваної сполуки було застосовано її здатність поглинати світло в УФ-області спектра. Водні розчини морфоліній 2-(5-(4-піридил)4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтію)-ацетату характеризуються наявністю піку при 275 нм (мал. 2).



Таблиця 2

Результати кількісного визначення морфоліній 2-(5-(4-піридил)-4-(2-метоксибеніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтію)-ацетату у 1% та 2,5% розчинах

Наважка, мл	Знайдено, %	Метрологічні характеристики
1% розчин		
2,00	0,966	$\bar{x} = 0,956$ $S^2 = 7,78 \cdot 10^{-5}$ $S = 8,82 \cdot 10^{-3}$ $RSD = 0,922\%$ $Dx = 2,27 \cdot 10^{-2}$ $e = 2,37\%$
2,00	0,967	
2,00	0,948	
2,00	0,954	
2,00	0,956	
2,00	0,946	
2,00	0,946	
2,5% розчин		
1,00	2,37	$\bar{x} = 2,37$ $S^2 = 3,07 \cdot 10^{-4}$ $S = 1,75 \cdot 10^{-2}$ $RSD = 0,738\%$ $Dx = 4,50 \cdot 10^{-2}$ $e = 1,90\%$
1,00	2,36	
1,00	2,38	
1,00	2,36	
1,00	2,39	
1,00	2,34	
1,00	2,34	



Мал. 2. Спектр поглинання морфоліній 2-(5-(4-піридил)-4-(2-метоксибеніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтію)-ацетату в УФ області

При аналітичній довжині хвилі були визначені межі концентрацій при яких спостерігається підпорядкованість закону Бера (табл. 1). Лінійна залежність величини оптичної густини від концентрації досліджуваного розчину описується рівнянням $A=0,2952C+0,008200$. Розраховані параметри лінійної залежності відповідають вимогам ДФУ [2].

Таблиця 1

Характеристики лінійної залежності

Параметри	Значення
L_{max} (нм)	275
$A_{1\%}^{1\text{см}}$	299
Підпорядкованість закону Бера (мг/100 мл)	1,2-3,6
Рівняння регресії	$A=b \cdot C+a$
Кутовий коефіцієнт b	0,008200
Вільний член a	0,002200
S_b	0,005400
S_a	0,9999
Коефіцієнт кореляції r (n=5)	0,646
RSD (%)	

Результати кількісного визначення морфоліній 2-(5-(4-піридил)-4-(2-метоксибеніл)-1,2,4-тріазол-3-ілтію)-ацетату у 1% та 2,5% розчинах (табл. 2) характеризуються низькими значеннями RSD, що свідчить про збіжність методик.

Отримані в результаті аналізів досліджуваної сполуки, а також її 1% та 2,5% водних розчинів дані свідчать, що субстанція, а також потенційні лікарські форми за своєю чистотою відповідають вимогам, які пред'являються для лікарських засобів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гостра токсичність 5-R1-4-R2-1,2,4-тріазол-3-тіонів та їх S-похідних / Каплаушенко А.Г., Панасенко О.І., Книш Є.Г. та ін.

Відомості про авторів: Книш Є.Г., д. фарм. н., професор, завідувач кафедри УЕФ ЗДМУ; Панасенко О.І., д. фарм. н., професор кафедри токсикологічної та неорганічної хімії ЗДМУ; Каплаушенко А.Г., к. фарм. н., асистент кафедри токсикологічної та неорганічної хімії ЗДМУ; Васюк С.О., д. фарм. н., доцент кафедри аналітичної хімії ЗДМУ; Тарханова О.О., аспірант кафедри аналітичної хімії ЗДМУ.

Адреса для листування: Каплаушенко Андрій Григорович, 69035 м. Запоріжжя, пр-т Маяковського, 26, E-mail: kaplaushenko@ukr.net, тел. (0612) 34-22-61

// Збірник наук. статей, всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю «Досягнення в галузі аналітичної, судово-медичної, клініч. токсикології та наркології». – Запоріжжя. 2007.- Вип. XX. – С. 70 – 79

2. Державна Фармакопея України. – 1-е вид. – Харків: PIPEГ, 2001. – С. 36-41, 187.

3. Каплаушенко А.Г., Панасенко О.І., Книш Є.Г. // Синтез, фізико-хімічні та біологічні властивості 2-(5-R1-4-R2-1,2,4-тріазол-3-тію)-ацетатних кислот - Фармацевтичний журнал. — Київ, 2, 2008. — С. 67-72.

4. Каплаушенко А.Г., Чадова, Д.С. Кравець // Пошук речовин з антиоксидантною активністю серед 5-R1-4-R2-1,2,4-тріазоліл-3-тіонів та їх S-похідних Запоріжський медичний журнал. — Запоріжжя, 2 2008. — С. 109-112.Л.В.

5. Лук'янчук В.Д., Каплаушенко А.Г., Рензак С.Я. // Фармакологічний скринінг солей 2-(5-R1-4-R2-1,2,4-тріазоліл-3-тію)-ацетатних кислот на моделі гострогіпоксичного синдрому Запоріжський медичний журнал. — Запоріжжя, 4, 2008. — С. 127-129.

6. Pat.6534252 USA, МПК7 G 03, C 7/46. Color photographic element comprising a common chromogenic coupler/ Szajewski Richard P., Irving Lyn M. — № 09/871310; Заявл. 31.05.2001; Опубл. 18.03.2003; НПК 430/383.

7. Pat.6570014 USA, МПК7 C 07 D 487/04. Process for preparing triazolopyrimidine derivatives/Chen Chien-Hsing, Yeh Chun-Lin, Chuang Yu-Hwa. — № 10/134504; Заявл. 30.04.2002; Опубл. 27.05.2003; НПК 544/263.

8. Pat.6645918 USA, МПК7 A 01 N 43/54, C 07 D 487/04. N-(1,2,4-Triazolozinyl)thiophenesulfonamide compounds and their use as herbicides/Arndt Kim E., Johnson T., Ouse D. — № 10/326730; Заявл. 19.12.2002; Опубл. 11.11.2003; НПК 504/241.