

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕАКЦИИ С НИНГИДРИНОМ В КОЛИЧЕСТВЕННОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ АЛИФАТИЧЕСКИХ АМИНОВ

Кляшева О. Н., Ярыгина Т. И., Басс С. М., Ван К. В.

ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Пермь, Россия (614990, Пермь, ул. Полевая, 2), e-mail: perm@pfa.ru

Синтезированы новые биологически активные соединения, превосходящие по антиамнестическому действию пиррацетам: ВКВ-1, ВКВ-2 и КОН-1 из группы производных 5-арил-4-ацил-3-гидрокси-1-гидрокси(карбокси)алкил-3-пирролин-2-она. Для определения посторонней (специфической) примеси алифатического амина соответственно аминокaproновой кислоты (АКК), аминоксусной кислоты (АУК) или 3-аминопропанола (3-АПР) разработана чувствительная спектрофотометрическая методика на основе реакции с нингидрином. Спектры поглощения продуктов реакции алифатический амин – нингидрин характеризуются двумя максимумами поглощения при длинах волн 400 ± 2 нм и 568 ± 2 нм. Аналитическая длина волны – 568 нм; максимальная оптическая плотность достигается при значениях pH: для АУК – 6,2; АКК – 6,8; 3-АПР – 6,8. Введение в реакционную массу аскорбиновой кислоты значительно увеличивает интенсивность поглощения; придаёт зависимости оптической плотности от концентрации линейный характер (r более 0,99). Разработана методика количественного определения АКК в 1 % и 5 % растворах для инъекций. Относительная ошибка среднего результата в модельных смесях не превышает $\pm 1,95$ %.

Ключевые слова: производные 5-арил-4-ацил-3-гидрокси-1-гидрокси(карбокси)алкил-3-пирролин-2-она, аминокaproновая кислота, аминоксусная кислота, 3-аминопропанол, спектрофотометрия, нингидрин.

REACTION USING THE NINGIDRIN FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF ALIPHATIC AMINES

Klyasheva O. N., Yarygina T. I., Bass S. M., Van K. V.

«The Perm state pharmaceutical academy» Ministry of Health of Russian Federation, Perm, Russia (614990, Perm, Polevay st.), e-mail: perm@pfa.ru

New biologically active substance which exceeded on anti-amnestic action of pyracetam: VKV-1, VKV-2 and KON-1 from group of derivatives of 5-aryl-4-acyl-3-hydroxy-1-hydroxy(carboxy)alkyl-3-pyrrolin-2-on are synthesized. The sensitive spectrophotometric technique for determination of ectogenic (specific) impurity of aliphatic amines according to aminocaproic acid (ACA), aminoacetic acid (AAA) and 3-aminopropanol (3-APR) on the basis of reaction with ningidrin is developed. Ranges of absorption of products of a reaction of aliphatic amines - ningidrin are characterized by two maxima of absorption with wavelengths at 400 ± 2 nm and 568 ± 2 nm. The analytical wavelength – 568 nm; the maximum of optical density is reached at values of pH: for AAA – 6,2; ACA – 6,8; 3-APR – 6,8. Introduction in the reaction mass of ascorbic acid considerably increases intensity of absorption; gives dependence of optical density on concentration linear character (r more 0,99). The technique of quantitative determination of ACA in 1 % and 5 % solutions for injections is developed. The relative standard deviation in model mixtures was no more than 1,95 %.

Keywords: derivatives of 5-aryl-4-acyl-3-hydroxy-1-hydroxy(carboxy)alkyl-3-pyrrolin-2-on, aminocaproic acid, aminoacetic acid, 3-aminopropanol, spectrophotometry, ningidrin.

Введение

В Пермской государственной фармацевтической академии синтезированы новые биологически активные соединения, превосходящие по антиамнестическому действию пиррацетам: ВКВ-1 и ВКВ-2 из группы производных 5-арил-4-ацил-3-гидрокси-1-карбоксиалкил-3-пирролин-2-она и КОН-1 из группы производных 5-арил-4-ацил-3-гидрокси-1-гидроксиалкил-3-пирролин-2-она [1]. В связи с рекомендацией к проведению доклинических испытаний нами проводятся исследования по разработке методов контроля качества и стандартизации субстанций и лекарственных форм этих соединений [3–5].

Исходя из схемы получения соединений ВКВ-1, ВКВ-2, КОН-1, посторонней (специфической) примесью в их субстанциях может быть алифатический амин: соответственно аминокaproновая кислота (АКК), аминокусная кислота (АУК) или 3-аминопропанол (3-АПР). АУК (глицин) и АКК широко применяются в медицинской практике [6].

Целью настоящего исследования явилась разработка спектрофотометрической методики количественного определения алифатических аминов АКК, АУК и 3-АПР. Для получения окрашенных продуктов использована реакция с нингидрином.

Материалы и методы исследования

В исследованиях использовались спектрофотометр СФ-2000; колориметр фотометрический КФК-3.

Растворители и реагенты: спирт этиловый 95 %, вода очищенная, АКК, АУК, 3-АПР, нингидрин, аскорбиновая кислота, фосфатные буферные растворы (рН 6,0-7,4) [2].

Результаты исследований и их обсуждение

Предварительными исследованиями выбраны оптимальные условия проведения реакции алифатический амин – нингидрин: нагревание реакционной массы на кипящей водяной бане в течение 30 мин; среда – спирт этиловый (20–30 % в реакционной смеси); объём буферного раствора от 4 до 6 мл.

Сняты спектры поглощения продуктов реакции, полученных при различных значениях рН (фосфатный буферный раствор, рН от 6,0 до 7,2), в интервале длин волн от 350 до 700 нм на спектрофотометре СФ-2000 в кювете с толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную. Концентрация исходных водных растворов аминов: АУК - 0,02 %; АКК- 0,05 %; 3-АПР – 0,03 %.

Спектры характеризуются двумя четко выраженными максимумами поглощения при длинах волн 400 ± 2 нм и 568 ± 2 нм и одним минимумом, лежащим в области 455–465 нм. Положение максимумов практически не зависит от рН буферного раствора. В качестве аналитической волны для алифатических аминов была выбрана 568 нм.

Реакция среды существенно влияет на интенсивность поглощения, максимальная оптическая плотность достигается при различных значениях рН: для АУК – 6,2; АКК – 6,8; 3-АПР – 6,8. Буферные растворы с этими значениями были использованы как оптимальные для соответствующих аминов.

Анализ литературных данных показал, что восстанавливающие вещества повышают чувствительность реакции. В качестве восстановителей чаще используют небольшие количества хлорида олова, хлорида титана, цианида калия, гидразина сульфата, аскорбиновой кислоты. Для исследования нами выбрана аскорбиновая кислота (нормальный

окислительно-восстановительный потенциал $+0,167$ В), которая является наиболее доступным и нетоксичным реагентом [7].

Измеряли оптическую плотность продуктов реакции алифатический амин – нингидрин, полученных при оптимальных значениях pH, при длине волны 568 нм. Реакцию проводили в двух вариантах: без добавления и с добавлением аскорбиновой кислоты. Результаты опытов представлены в таблице 1. Введение аскорбиновой кислоты в реакционную массу не изменяет характера спектра поглощения продукта реакции амин – нингидрин, но значительно увеличивает интенсивность поглощения.

Таблица 1. Влияние аскорбиновой кислоты на интенсивность поглощения продуктов реакции алифатический амин – нингидрин

Алифатический амин	Оптическая плотность продуктов реакции алифатический амин – нингидрин	
	Без добавления аскорбиновой кислоты	С добавлением аскорбиновой кислоты
АУК	0,328	0,505 (+ 54%)
АКК	0,324	0,473 (+ 46%)
3-АПР	0,101	0,485 (+ 380%)

Для проверки соблюдения основного закона светопоглощения продуктов реакции алифатических аминов с нингидрином (определение линейности) построены графики зависимости оптической плотности (А) от концентрации амина в фотометрируемом растворе (С, мкг/мл) (рисунки 1–3; график № 1 – продукт получен без добавления аскорбиновой кислоты; график № 2 – с добавлением аскорбиновой кислоты).

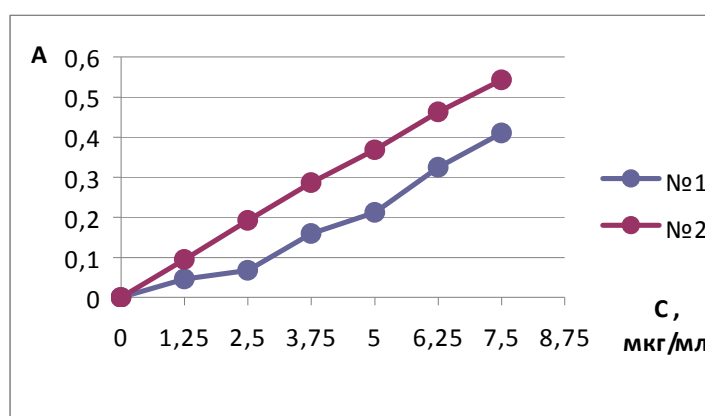


Рис. 1. Градуировочный график продукта реакции АКК – нингидрин

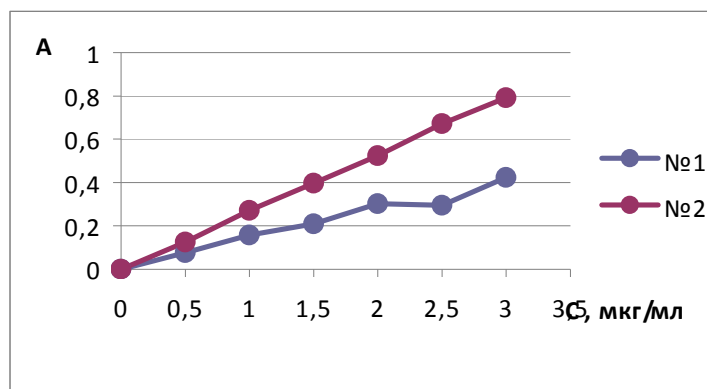


Рис. 2. Градуировочный график продукта реакции АУК – нингидрин

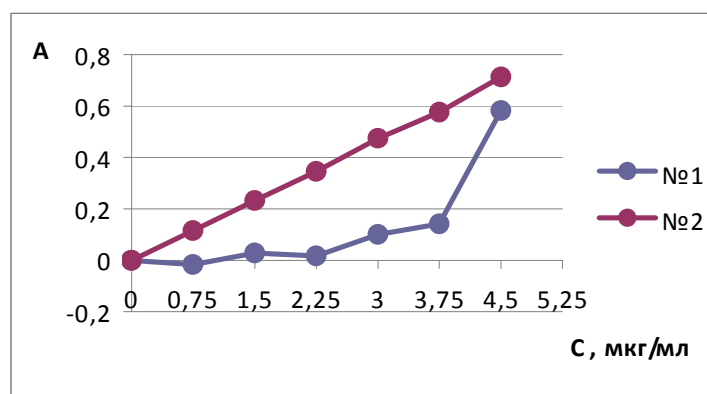


Рис. 3. Градуировочный график продукта реакции 3-АПР – нингидрин

Исследования показали, что введение аскорбиновой кислоты в реакционную массу значительно увеличивает интенсивность светопоглощения, придаёт зависимости оптической плотности от концентрации линейный характер (коэффициент корреляции линейной зависимости более 0,99). Поэтому в дальнейших опытах продукты реакций аминов с нингидрином получали в присутствии аскорбиновой кислоты.

Рассчитаны молярный и удельный показатели поглощения продуктов реакций и пределы обнаружения АКК, АУК и 3-АПР спектрофотометрическим методом (приняв A_{\min} 0,025) (таблица 2).

Таблица 2. Валидационные характеристики спектрофотометрической методики

Алифатический амин	Область линейности графика, мкг/мл	Показатели поглощения		Предел обнаружения	
		удельный	молярный	мкг/мл	мкмоль/л
АУК	0,50–3,00	2500	18800	0,100	1,33
АКК	1,25–7,50	757	9930	0,330	2,50
3-АПР	0,75–4,50	1620	12200	0,155	2,05

Установлено, что исследуемые реакции достаточно чувствительны, поэтому могут быть использованы для анализа примесей алифатических аминов в субстанциях соединений ВКВ-1, ВКВ-2, КОН-1, а также количественного определения АУК (глицина) и АКК (субстанции, лекарственные препараты).

Методика определения АКК в растворах для инъекций.

В промышленности выпускают АКК в виде 5 % раствора для инфузий во флаконе 100 мл. В аптеке изготавливают 1 % и 5 % растворы АКК для инъекций [6]. Растворы содержат натрия хлорид (0,9 %).

Методика. 1 мл препарата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл (1 % раствор) или 250 мл (5 % раствор), доводят водой до метки, перемешивают (раствор А). В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 3 мл раствора А, добавляют 4 мл фосфатного буферного раствора с рН 6,8, 2 мл 1 % раствора нингидрина в спирте этиловом 95 %, 2 мл 0,05 % водного раствора аскорбиновой кислоты. Содержимое колбы нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин, быстро охлаждают, доводят водой до метки и перемешивают.

У полученного раствора измеряют оптическую плотность при длине волны 568 нм в кювете толщиной 1 см.

В качестве раствора сравнения используют контрольный опыт: в мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 2 мл воды, 4 мл фосфатного буферного раствора с рН 6,8, и далее поступают, как указано в основной методике.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора стандартного образца (СО).

Приготовление раствора СО. Около 0,0500 г (точная навеска) субстанции АКК помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяют в воде, доводят объем колбы тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор В). В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 3 мл раствора В и далее поступают, как указано в основной методике.

Содержание АКК (X) в 1 мл препарата вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_{\text{ЛП}} * V * 100 * a_{\text{СТ}} * 3}{A_{\text{СТ}} * a_{\text{ЛП}} * 3 * 250 * 100} = \frac{A_{\text{ЛП}} * a_{\text{СТ}} * V}{A_{\text{СТ}} * a_{\text{ЛП}} * 250}$$

где $A_{\text{ЛП}}$ – оптическая плотность исследуемого раствора;

$A_{\text{СТ}}$ – оптическая плотность раствора СО;

$a_{\text{ЛП}}$ – навеска лекарственного препарата, мл;

$a_{\text{СТ}}$ – навеска СО, г;

V – объем мерной колбы для приготовления разведения препарата.

Оценка правильности результатов осуществлялась путем статистической обработки выборок, полученных в ходе количественного анализа АКК в модельных пробах на трех уровнях концентрации в пределах рекомендуемой аналитической области методики (80,100,120 % от количества принятого за 100 % – 0,05 г). По полученным данным построен график зависимости оптической плотности от концентрации аминокaproновой кислоты. Линия тренда пересекает ось «Оптическая плотность» в точке 0, что свидетельствует о правильности разработанной методики.

Для определения повторяемости (сходимости) результатов методики готовили модельные смеси 1 % и 5 % растворов АКК и раствор СО. Проводили по семь параллельных определений. Результаты исследований приведены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3. Повторяемость (сходимость) результатов определения 1 % раствора АКК

X_i	f	x (сред)	S	Sx
0,0102; 0,0102; 0,0100; 0,0098; 0,0098; 0,0100; 0,0101	6	0,0100	0,000195	0,00008
$t(P;f)$	Δx	Δx (сред)	ε , %	ε (сред), %
2,45	0,000478	0,000195	4,78	1,95

Таблица 4. Повторяемость (сходимость) результатов определения 5 % раствора АКК

X_i	f	x (сред)	S	Sx
0,0502; 0,0503; 0,0501; 0,0502; 0,0503; 0,0502; 0,0502	6	0,0502	0,00094	0,00038
$t(P;f)$	Δx	Δx (сред)	ε , %	ε (сред), %
2,45	0,0023	0,00094	4,58	1,88

Разработанная методика дает точные результаты, проста в исполнении, экономична, не требует использования токсичных реагентов.

Выводы

1. Выбраны оптимальные условия проведения реакции алифатический амин – нингидрин; аналитическая длина волны – 568 нм; максимальная оптическая плотность достигается при значениях рН: для АУК – 6,2; АКК – 6,8; 3-АПР – 6,8.
2. Введение аскорбиновой кислоты в реакционную массу не изменяет характера спектра поглощения продукта реакции амин – нингидрин, но значительно увеличивает интенсивность поглощения; придаёт зависимости оптической плотности от концентрации линейный характер (r более 0,99).

3. Исследуемые реакции достаточно чувствительны, поэтому могут быть использованы для анализа примесей алифатических аминов в субстанциях соединений ВКВ-1, ВКВ-2, КОН-1, а также количественного определения АУК (глицина) и АКК (субстанции, лекарственные препараты).

4. Разработана методика количественного определения АКК в 1 % и 5 % растворах для инъекций. Относительная ошибка среднего результата в модельных смесях не превышает $\pm 1,95$ %.

Список литературы

1. Гейн В. Л. Синтез и фармакологическая активность 1-замещенных 5-арил-4-ацил-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов / В.Л. Гейн, Л.Ф. Гейн, Н.Ю. Порсева [и др.] // Хим.-фармац. жур. – 1998. – Т. 32, № 5. – С. 23-25.
2. Государственная Фармакопея РФ / М-во здравоохранения Рос. Федерации. – 12-е изд., репринт. – «Изд-во «Научный центр экспертиз средств медицинского применения», 2008. – Ч. 1 – 704 с.: ил.
3. Кляшева О. Н. Разработка унифицированных методик количественного определения новых биологически активных соединений из группы производных 3-пирролин-2-она / О. Н. Кляшева, Т. И. Ярыгина, К. В. Ван // Сб. науч. трудов и тезисов: РУДН. – М., 2011. – С. 123-124.
4. Кляшева О. Н. Разработка методик доказательства подлинности производных 3-пирролин-2-она / О. Н. Кляшева, Т. И. Ярыгина, К. В. Ван, В. Л. Гейн // Сб. материалов Всерос. конф. с междунар. участием, посвященной 75-летию со дня рождения В. В. Кормачева «Современные проблемы химической науки и образования»: в 2 т. – Т II. – Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, 2012. – С. 140-142.
5. Кляшева О. Н. Оценка качества субстанции нового биологически активного соединения / О. Н. Кляшева, Т. И. Ярыгина, Т. Ф. Одегова [и др.] // Фармация. – 2012. – Т. 61, № 5. – С. 8-10.
6. Машковский М. Д. Лекарственные средства. – 15-е изд., перераб., испр. и доп./ М. Д. Машковский. – М.: «Новая волна»; Издатель Умеренов, 2008. – 111 с.
7. Ярыгина Т. И. Разработка методики количественного определения тауфона (таурина) // Вестник РУДН. Науч. журнал, серия «Медицина». – 2010. – № 4. – С. 522-525.

Рецензенты:

Коркодинова Любовь Михайловна, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармацевтической химии ФОО, ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России, г. Пермь.

Михайловский Александр Георгиевич, доктор фармацевтических наук, доцент, заведующий кафедрой неорганической химии ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России, г. Пермь.