

**Государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Пермская государственная фармацевтическая академия»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

*На правах рукописи*

**Кляшева Ольга Николаевна**

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИК АНАЛИЗА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ  
НОВОГО БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО СОЕДИНЕНИЯ КОН-1,  
ПРОЯВЛЯЮЩЕГО НООТРОПНОЕ ДЕЙСТВИЕ**

14.04.02. – фармацевтическая химия, фармакогнозия

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:  
доктор фармацевтических наук,  
профессор Ярыгина Т.И.

Пермь - 2014

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|  |    |
|--|----|
| ВВЕДЕНИЕ.....  | 6  |
| ГЛАВА 1. НООТРОПНЫЕ СРЕДСТВА. СИНТЕЗ, ХИМИЧЕСКИЕ<br>СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ 3-ГИДРОКСИ-3-ПИРРОЛИН-2-<br>ОНА. МЕТОДЫ АНАЛИЗА СОЕДИНЕНИЙ, СОДЕРЖАЩИХ<br>ЕНОЛЬНУЮ ГИДРОКСИЛЬНУЮ ГРУППУ.<br>СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ В ВИДИМОЙ ОБЛАСТИ СПЕКТРА В<br>АНАЛИЗЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ<br>(Обзор литературы)..... | 11 |
| 1.1 Ноотропные средства.....   | 11 |
| 1.2. Синтез 1,4,5-тризамещенных 3-гидрокси-3-пирролин-2-онов....   | 14 |
| 1.3. Химические свойства замещенных 5-арил-3-гидрокси-3-пирролин-<br>2-онов.....   | 17 |
| 1.3.1. Взаимодействие с моноклеофильными реагентами.....   | 17 |
| 1.3.2. Взаимодействие с бинуклеофильными реагентами.....   | 19 |
| 1.4. Методы анализа соединений, содержащих енольную<br>гидроксильную группу.....   | 23 |
| 1.5. Спектрофотометрия в видимой области спектра в анализе<br>лекарственных средств.....   | 26 |
| ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1.....   | 31 |
| ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ<br>ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....  | 33 |
| 2.1. Характеристика объектов, вспомогательных материалов,<br>оборудования и реактивов.....   | 33 |
| 2.2. Методы исследования.....  | 35 |
| ГЛАВА 3. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОН-1.....   | 37 |
| 3.1. Физические свойства.....  | 37 |
| 3.2. Показатели и нормы качества.....  | 39 |
| 3.2.1. Прозрачность и цветность растворов.....   | 39 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 3.2.2. | Кислотность и щелочность.....   | 39 |
| 3.2.3. | Потеря в массе при высушивании.....   | 40 |
| 3.2.4. | Хлориды и сульфаты.....   | 41 |
| 3.2.5. | Сульфатная зола и тяжелые металлы.....  | 42 |
| 3.3.   | Спектральные характеристики.....  | 43 |
| 3.3.1. | ИК-спектрофотометрия.....   | 43 |
| 3.3.2. | УФ-спектрофотометрия.....   | 44 |
| 3.3.3. | $^1\text{H}$ ЯМР-спектрофотометрия.....   | 47 |
| 3.4.   | Химические свойства. Реакции подлинности.....   | 48 |
| 3.5    | Микробиологическая чистота.....   | 50 |
|        | ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3.....  | 53 |
|        | ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО<br>ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБСТАНЦИИ КОН-1.....                    | 55 |
| 4.1.   | Титриметрический метод.....   | 55 |
| 4.1.1. | Определение константы ионизации.....  | 55 |
| 4.1.2. | Титрование с потенциометрическим определением точки<br>эквивалентности.....                         | 57 |
| 4.1.3. | Титрование с визуальным определением точки<br>эквивалентности.....                                  | 58 |
| 4.1.4. | Валидация методики.....   | 59 |
| 4.1.5. | Апробация методики.....   | 61 |
| 4.2.   | Спектрофотометрия в УФ области.....   | 62 |
| 4.3.   | Спектрофотометрия в видимой области на основе реакции КОН-1<br>с раствором железа(III) хлорида..... | 69 |
| 4.3.1. | Спектры поглощения продукта реакции КОН-1 с железа(III)<br>хлоридом.....                            | 69 |
| 4.3.2. | Изучение влияния количества воды на образование продукта<br>реакции КОН-1- железо(III).....         | 71 |
| 4.3.3. | Определение устойчивости продукта реакции КОН-1-<br>железо(III).....                                | 72 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.3.4. Изучение состава и оптимальных условий образования продукта реакции КОН-1- железо(III).....                             | 73  |
| 4.3.5. Валидация разработанной методики.....   | 76  |
| ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4.....   | 84  |
| ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОСТОРОННИХ (СПЕЦИФИЧЕСКИХ) ПРИМЕСЕЙ В СУБСТАНЦИИ КОН-1.....                           | 86  |
| 5.1. Разработка методики определения примеси 3-АПР в субстанции КОН-1.....   | 86  |
| 5.1.1. Спектры поглощения продукта реакции 3-АПР с нингидрином.....  | 86  |
| 5.1.2. Исследование влияния восстановителя на интенсивность и стабильность поглощения продукта реакции 3-АПР с нингидрином.... | 88  |
| 5.1.3. Валидация разработанной методики.....   | 89  |
| 5.2. Разработка методики определения примесей МЭАПВК и БАА. в субстанции КОН-1 методом обращённо-фазной ВЭЖХ.....              | 97  |
| 5.2.1. Выбор условий хроматографического разделения посторонних примесей в субстанции КОН-1.....                               | 97  |
| 5.2.2. Валидация разработанной методики.....   | 102 |
| ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5.....   | 111 |
| ГЛАВА 6. ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ СУБСТАНЦИИ КОН-1 ПРИ ХРАНЕНИИ В ЕСТЕСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ.....                                      | 113 |
| ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 6.....   | 118 |
| ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.....  | 119 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....   | 121 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ.....  | 140 |

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

|            |   |
|------------|---|
| ВЭЖХ       | Высоко-эффективная жидкостная хроматография   |
| УФ         | Ультрафиолетовый свет                         |
| ЯМР        | Ядерно-магнитный резонанс                     |
| ИК         | Инфракрасный свет                             |
| БАВ        | Биологически активное вещество                |
| ПМР спектр | Спектр протонного магнитного резонанса        |
| БАС        | Биологически активное соединение              |
| ФСП        | Фармакопейная статья предприятия              |
| ГАМК       | Гамма-аминомасляная кислота                   |
| ЦНС        | Центральная нервная система                   |
| АТФ        | Аденозинтрифосфат                             |
| РНК        | Рибонуклеиновая кислота                       |
| УЗ         | Ультразвук                                    |
| РСО        | Раствор стандартного образца                  |
| 3-АПР      | 3-аминопропанол                               |
| МЭАПВК     | Метилловый эфир ацетилпировиноградной кислоты |
| 4-ББА      | 4-бромбензальдегид                            |

## ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Одной из главных задач фармации является создание и освоение производства новых высокоэффективных лекарственных средств, в том числе и различных психотропных препаратов. В последние годы большой интерес исследователей вызывает группа ноотропов. Указанные средства широко используются в различных областях медицины. Однако все известные препараты этой группы обладают лишь отдельными элементами ноотропной активности или являются недостаточно эффективными, или плохо переносимыми из-за побочных эффектов. Поэтому поиск и внедрение новых наиболее активных и малотоксичных ноотропных средств остается актуальной проблемой.

В настоящее время среди ноотропных препаратов преобладает группа рацетамов: - пирацетам, анирацетам, фенилпирацетам, фенотропил и др., обладающая широким спектром фармакологической активности, поэтому представляет интерес направленный поиск новых биологически активных соединений в ряду производных пирролин-2-она. В ГБОУ ВПО «ПГФА» на кафедре физической и коллоидной химии под руководством проф. Гейна В.Л. на основе трехкомпонентной реакции разработан простой способ синтеза 4-ацетил-5-(4-бромфенил)-3-гидрокси-1-(3-гидроксипропил)-3-пирролин-2-она (КОН-1). Это соединение показало антиамнестическое действие более высокое, чем у пирацетама, поэтому рекомендовано для доклинических исследований в качестве ноотропного средства [24,115,117].

В связи с этим встает необходимость всестороннего изучения его физико-химических свойств с использованием как классических, так и современных методов анализа, а также разработки методов контроля качества и стандартизации субстанции и лекарственных форм указанного соединения.

Цель и задачи. На основе комплекса физических, физико-химических и химических методов разработать методики оценки качества соединения КОН-1 и использовать их для стандартизации его субстанции.

Для достижения поставленной цели необходимо решить задачи:

- проанализировать и обобщить данные литературы, касающиеся поиска соединений, обладающих ноотропным действием; физических и химических свойств производных 1,4,5-тризамещенных 3-гидрокси-3-пирролин-2-она; применению спектрофотометрии в видимой области в анализе лекарственных препаратов и новых БАС;
- изучить физико-химические свойства субстанции КОН-1; установить научно-обоснованные показатели и нормы качества; предложить реакции подлинности КОН-1;
- исследовать УФ-, ИК-, ПМР-спектры соединения КОН-1, оценить полезность полученных данных для его стандартизации; использовать спектральные методы для подтверждения подлинности соединения;
- изучить кислотно-основные свойства соединения, определить его константу ионизации; разработать титриметрическую методику количественного анализа субстанции КОН-1;
- изучить возможность использования спектрофотометрии в УФ и видимой областях спектра в количественном определении КОН-1; разработать спектрофотометрические методики анализа соединения;
- разработать инструментальные методики (ВЭЖХ, спектрофотометрия в видимой области) для определения посторонних (специфических) примесей в субстанции КОН-1;
- изучить устойчивость субстанции соединения при хранении, установить научно-обоснованные сроки годности объекта исследования;
- составить проект ФСП на субстанцию КОН-1.

Научная новизна. На основании комплексного химико-фармацевтического исследования нового БАС КОН-1 разработана оптимальная система оценки качества субстанции этого соединения.

Установлены физические константы, УФ-, ИК- и ПМР-спектральные характеристики КОН-1.

Нормированы показатели, характеризующие подлинность и доброкачественность КОН-1, предложены реакции подлинности. Разработаны и валидированы методики количественного определения субстанции БАС.

Найдены оптимальные условия обнаружения возможных посторонних примесей в субстанции исследуемого БАВ методами ВЭЖХ и спектрофотометрии в видимой области; определения микробиологической чистоты. Разработаны и валидированы инструментальные методики для определения посторонних (специфических) примесей в субстанции КОН-1.

Изучена стабильность и установлены сроки годности субстанции КОН-1.

#### Практическая значимость и внедрение результатов работы.

На основе комплекса химических и инструментальных методов разработаны рациональные методики оценки качества субстанции КОН-1.

Установлены нормы качества исследуемого соединения, разработан проект ФСП.

Способы оценки качества субстанции КОН-1, введенные в ФСП, и унифицированная методика спектрофотометрического определения соединений из группы производных 3-пирролин-2-она с положительной оценкой апробированы на предприятии ЗАО «Медисорб» (г. Пермь).

Стандартизованные в соответствии с требованиями проекта ФСП серии субстанции КОН-1 переданы на кафедры токсикологической химии и физиологии с основами анатомии ГБОУ ВПО ПГФА для проведения фармакокинетических исследований соединения.

Отдельные фрагменты диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтической химии ФОО ГБОУ ВПО ПГФА; использованы при разработке учебно-методического информационного комплекса «Анализ по функциональным группам (енольный гидроксил)» для дистанционного обучения студентов 3 курса фармацевтических ВУЗов.



Апробация работы. Результаты и основные положения диссертационной работы обсуждены на Российской научно-практической конференции, посвященной 75-летию ПГФА «Актуальные проблемы науки фармацевтических и медицинских вузов: от разработки до коммерциализации», Пермь, 2011 г.; 77-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых учёных с международным участием «Молодёжная наука и современность», Курск, 18-19 апреля 2012 г.; V международной научно-практической конференции «Фармация и общественное здоровье», Екатеринбург, 2012 г.; Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 75-летию со дня рождения В.В. Кормачева «Современные проблемы химической науки и образования», Чебоксары, 2012 г.; Российской научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Современные проблемы фармацевтической науки», посвященной 75-летию ПГФА, Пермь, 2012 г.; Молодежной конференции «Международный год химии», Казань, 2011 г.; II-ой Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация - потенциал будущего», Санкт Петербург, 2012 г.; III Международной студенческой научной конференции «Клинические и теоретические аспекты современной медицины», Москва, 2011 г.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом НИР ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России. Номер государственной регистрации 01.9.50.007417.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты проведённого исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 2 и 3 паспорта специальности - фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Личное участие автора в получении научных результатов. Основные экспериментальные результаты, приведенные в диссертации, получены самим автором или при его непосредственном участии. Автором выполнены исследования по установлению физических, физико-химических, химических свойств субстанции КОН-1, на основе которых выполнены реакции подлинности, разработаны методики количественного определения и оценки чистоты, изучены стабильность и установлены сроки годности субстанции, систематизированы полученные результаты, составлен проект ФСП.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, из них 11 статей, в том числе в изданиях Перечня ВАК - 3, и 4 тезисов докладов.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, 6 глав, включающих обзор литературы, главы характеризующей объекты и методы исследования, 4 главы, содержащих результаты экспериментальных исследований, выводов, списка литературы, включающего 167 наименований, приложения. Работа изложена на 139 (+приложение) страницах машинописного текста, включает 45 таблиц, 31 рисунок, 2 схемы и 14 страниц приложения.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Физико-химические свойства, показатели и нормы качества, микробиологическая чистота, реакции подлинности субстанции КОН-1.
2. Использование спектральных методов для подтверждения подлинности субстанции КОН-1.
3. Результаты изучения кислотно-основных свойств соединения КОН-1; алкалиметрическая методика количественного анализа субстанции КОН-1.
4. Инструментальные методики (спектрофотометрия в УФ- и видимой областях, ВЭЖХ) для определения посторонних (специфических) примесей и количественного определения субстанции КОН-1.
5. Результаты исследования стабильности и установления срока годности субстанции КОН-1.

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

## НООТРОПНЫЕ СРЕДСТВА. СИНТЕЗ, ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ 3-ГИДРОКСИ-3-ПИРРОЛИН-2-ОНА. МЕТОДЫ АНАЛИЗА СОЕДИНЕНИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ЕНОЛЬНУЮ ГИДРОКСИЛЬНУЮ ГРУППУ. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ В ВИДИМОЙ ОБЛАСТИ СПЕКТРА В АНАЛИЗЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

### 1.1. Ноотропные средства

История применения ноотропных препаратов началась с открытия пирацетама, что явилось принципиально новым этапом в развитии психофармакотерапии и привело к формированию ноотропной концепции [46, 51, 139, 145].

По определению Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), к группе ноотропных препаратов относят лекарственные средства, способные оказывать прямое активирующее влияние на процессы обучения, улучшать память и умственную деятельность, а также повышать устойчивость мозга к агрессивным воздействиям [51, 133].

В настоящее время ноотропные средства классифицируют по комбинированному принципу, включая клиническую эффективность, широту терапевтических эффектов и механизмов действия. Различают две большие группы ноотропов [20, 122, 166].

*1. Ноотропы прямого действия («истинные ноотропы»).* Содержит препараты с доминирующими мнестическими эффектами. Группа включает несколько подгрупп:

- Пирролидоновые производные (рацетамы): пирацетам, оксирацетам, нирацетам, прамирацетам, этирацетам, дипрацетам, ролзирацетам, небрацетам, изацетам и др. [141, 148, 151, 165, 166].
- Холинергические средства: холин хлорид, лецитин, физостигмин, такрин, галантамин и др.

- Нейропептиды и их аналоги: эбиратид, семакс, селанк, соматостатин, тиролиберин, пептидные аналоги пирацетама (ноопент) [32, 39, 42, 57, 58, 86, 87, 106, 107, 109, 122, 129].
- Возбуждающие аминокислоты и вещества, влияющие на систему возбуждающих аминокислот: глутаминовая кислота, глицин, мемантин, Д-циклосерин, нооглютил [102].

2. *Нейропротекторы (ноотропы смешанного действия, у которых мнемотропный эффект является следствием других видов активности) («неистинные ноотропы»)*. Входят следующие подгруппы:

- Церебральные вазодилататоры: винкамин, винпоцетин, ницерголин, винконат, виндебумол и др. [143, 166].
- Вещества, влияющие на систему ГАМК: аминалон (гаммалон), пантогам, пикамилон, дигам, никотинамид, фенибут, фенотропил, натрия оксибутират [4, 27, 108, 118].
- Активаторы метаболизма мозга: милдронат, фосфатидилсерин, ксантиновые производные [106, 154].
- Антагонисты кальция: нимодипин, циннаризин, флунаризин и др.
- Антиоксиданты: месидол, эксифон, тирилазад, меклофеноксат, тиотриазолин, эмоксипин и др.
- Вещества разных групп: этимизил, оротовая кислота, метилглюкооротат, оксометацил, беглимин, нафтидрофутил, женьшень, лимонник, мемоплант, гинкго билоба и др. [51, 134, 144, 149, 157, 164].

Спектр фармакологической активности у прямых ноотропов достаточно широк [51, 103, 133]. Главным является мнемотропное действие (улучшение памяти и обучения). Кроме того, они оказывают положительное влияние на мозговой кровоток; им присущи противосудорожная, антигипоксическая, антиоксидантная и другие виды активности [32, 46, 130, 141, 146, 148].

Ноотропы первого поколения – рацетами – прочно зарекомендовали себя в медицине и лидируют в списке ноотропных средств [103]. Центральные эффекты этих препаратов продолжительны, т.к. в отличие от самой ГАМК, рацетами проникают через гематоэнцефалический барьер, накапливаются в коре больших полушарий и мозжечка [11, 46]. Ноотропом нового поколения с широким спектром эффектов является фенотропил. Применение препарата в медицинской практике позволило значительно повысить эффективность лечения и поставить на новый уровень качество жизни пациентов с патологией ЦНС [4, 118].

К ноотропным препаратам нового поколения относятся также комбинированные лекарственные средства, содержащие рацетам в сочетании с субстанциями, усиливающими его позитивные свойства (антиоксидантное, противоишемическое, мнемотропное и т.д.). Известны комбинации пирацетама с диазепамом (Диапирам), оротовой кислотой (Ороцетам), циннаризином (Фезам), аминалоном (Олатропил) и тиотриазолином (Тиоцетам) [6, 103, 123]. Указанные препараты одновременно отвечают нескольким требованиям. Они активизируют фазы запоминания, снимают головокружения, головные боли, устраняют бессонницу, угнетенное состояние, существенно повышают работоспособность человека.

Механизм действия рацетамов точно не установлен [19, 51, 167]. Известно, что рацетами влияют на основные нейромедиаторные синаптические системы – ГАМК-, холин-, дофамин-, глутамат- или глицинергическую [1, 19, 39, 46, 55, 56, 140, 141, 152]. Нормализуются метаболические процессы в нейронах (обмен АТФ, активизация синтеза РНК и протеинов, нуклеотидов, фосфолипидов). Несомненным компонентом действия рацетамов является ускорение оборота ГАМК в коре головного мозга. [18, 35, 36, 142, 148].

Известные ноотропы не лишены недостатков [51, 123, 133]. Стратегия поиска новых ноотропных средств ориентирована, прежде всего, на мнемотропное действие, т.е. на способность вещества улучшать обучение и

память, как в эксперименте, так и в клинике. Антиамнестическое действие ноотропа должно проявляться при различных видах амнезии [15, 46, 111, 130].

Предпринимались попытки создания новых препаратов, которые по структуре походили бы на рацематы, но превосходили бы их по активности. Перспективным явилось исследование производных фенилпирролин-2-онов, антиамнестическое действие которых превосходит пираретам в десятки раз [5].

Проведено изучение психотропных и церебропротективных свойств новых структурных аналогов фенотропила [27, 36]. Рекомендовано дальнейшее изучение соединения РГПУ-87 в качестве антидепрессанта с ноотропным и церебропротекторным действием. [36, 116].

Осуществлён поиск соединений, обладающих выраженным психотропным действием, в ряду новых гетероциклических производных гамма-аминомасляной (ГАМК) и глутаминовой кислот. Ноотропную активность, сопоставимую с активностью препаратов сравнения фенотропилом и фенибутом, проявило соединение РГПУ-195 [35, 100, 119].

## **1.2. Синтез 1,4,5-тризамещенных 3-гидрокси-3-пирролин-2-онов**

С целью получения потенциально биологически активных соединений, обладающих в т.ч. и ноотропным действием, осуществлен синтез пирролинонов, содержащих в положении 1 различным образом функционализированный заместитель (алкильный, гидроксиалкильный, карбоксиалкильный, аминокарбонилметильный, гетерильный), который является фармакофорным фрагментом молекулы соединения [26] (схема 1).

### **Синтез 5-арил-4-ацил-1-алкил-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов (на примере 5-арил-4-ацил-1-пропил-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов)**

Установлено [23, 26], что они образуются при взаимодействии метиловых эфиров ацетил- и бензоилпировиноградных кислот со смесью

ароматического альдегида и пропиламина (при комнатной температуре в диоксане) (схема 1, I).

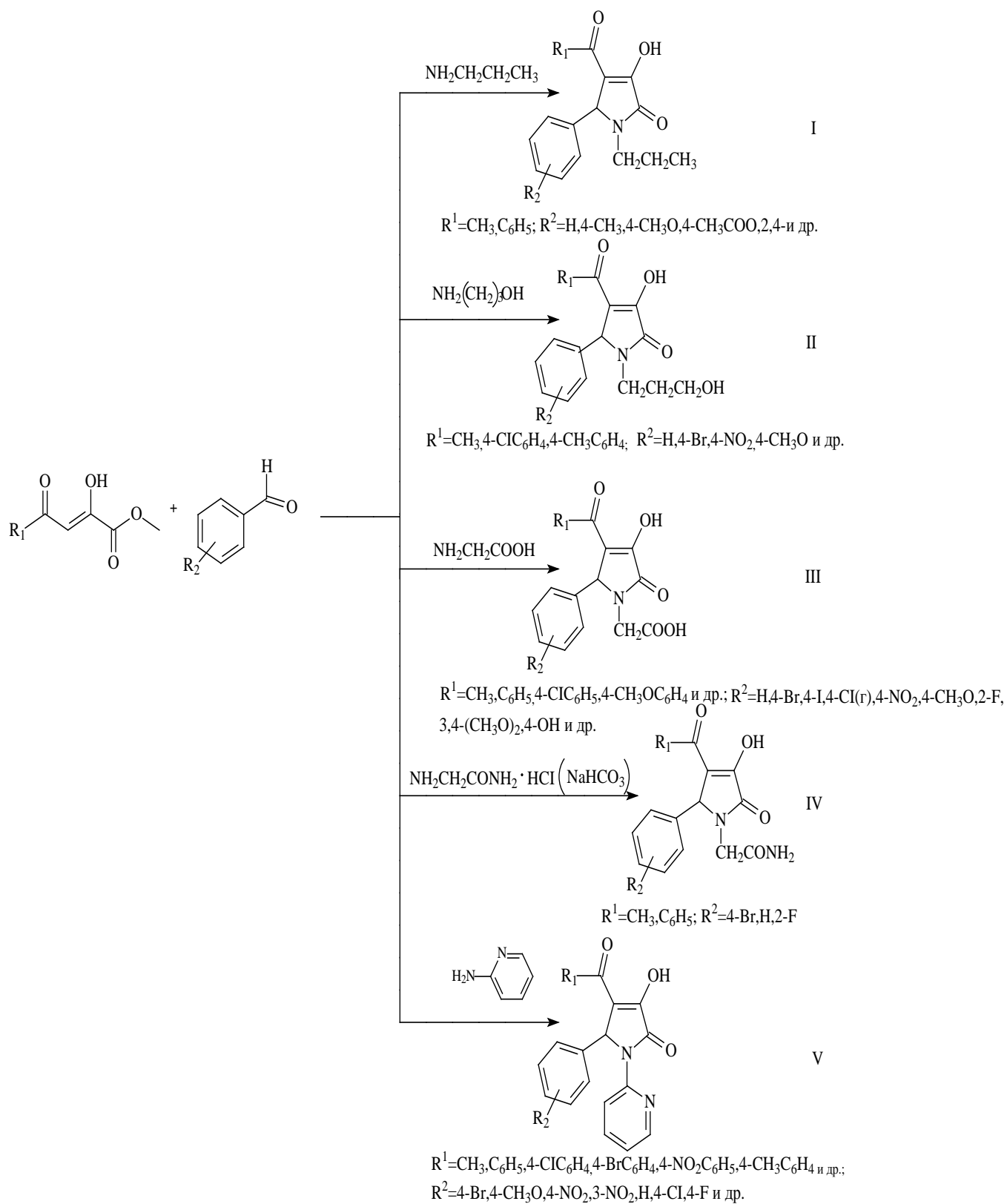


Схема 1 - Синтез 1,4,5-тризамещенных 3-гидрокси-3-пирролин-2-онов (I, II, III, IV, V)

**Синтез 5-арил-4-ацил-1-гидроксиалкил-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов  
(на примере 5-арил-4-ацил-1-(3-гидроксипропил)-3-гидрокси-3-  
пирролин-2-онов)**

Соединения были получены при взаимодействии метиловых эфиров ацетил- и ароилпировиноградных кислот со смесью ароматического альдегида и 3-аминопропанола в водно-спиртовой смеси [26] (схема 1; II).

**Синтез 5-арил-4-ацил-1-карбоксиалкил-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов  
(на примере 5-арил-4-ацил-1-карбоксиметил-3-гидрокси-3-пирролин-2-  
онов)**

Установлено, что соединения образуются при взаимодействии метиловых эфиров ацетил- и ароилпировиноградных кислот со смесью ароматического альдегида и гликокола в водно-спиртовой смеси при кратковременном нагревании [24, 25, 115] (схема 1, III).

**Синтез 5-арил-4-ацил-1-аминокарбонилметил-3-гидрокси-3-пирролин-  
2-онов**

Получены при взаимодействии в аналогичных условиях метиловых эфиров ацилпировиноградных кислот со смесью ароматического альдегида и гидрохлорида глицинамида [26] (схема 1, IV).

**Синтез 5-арил-4-ацетил-1-гетерил-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов (на  
примере 5-арил-4-ацил-1-(2-пиридил)-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов)**

Осуществляется при кратковременном нагревании эквимольных количеств метиловых эфиров ацилпировиноградных кислот, ароматического альдегида и 2-аминопиридина в среде ледяной уксусной кислоты [82, 92] (схема 1, V).

Все полученные соединения (I - V), как правило, представляют собой бесцветные или бледно-желтые кристаллические вещества, практически



нерастворимые в воде, растворимые в ДМСО, ДМФА, ацетонитриле, ледяной уксусной кислоте. Имеют характерные температуры плавления.

Исследования показали, что среди 1,4,5-тризамещенных 3-гидрокси-3-пирролин-2-онов обнаружены вещества, обладающие ноотропной активностью (24, 25, 50, 80, 92, 115, 117).

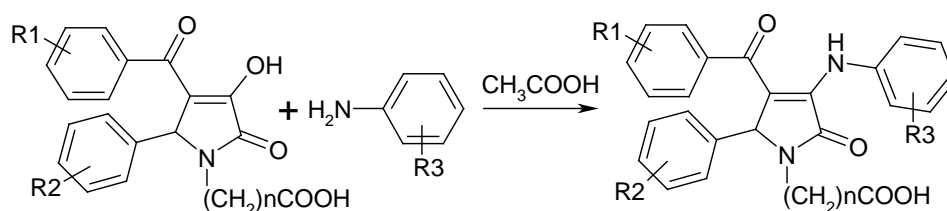
### 1.3. Химические свойства замещенных 5-арил-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов

#### 1.3.1. Взаимодействие с моноклеофильными реагентами.

4,5-Дизамещенные 3-гидрокси-3-пирролин-2-оны содержат несколько реакционных центров и взаимодействуют с различными моноклеофильными реагентами [16, 17, 23, 26, 80, 92, 114].

#### Взаимодействие 1-замещенных 5-арил-4-ацил-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов с ароматическими аминами.

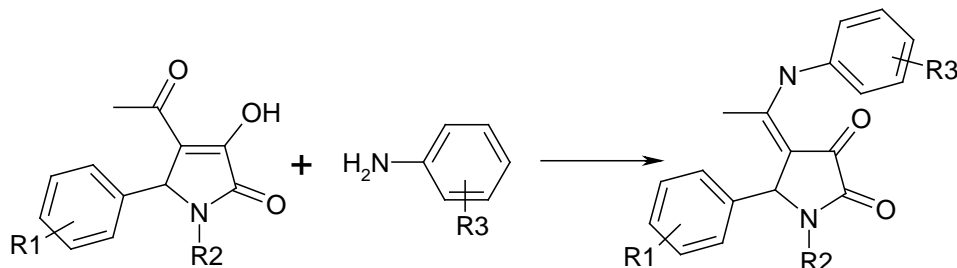
Установлено, что реакция 5-арил-4-арил-1-карбоксивалкил-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов протекает в условиях кипячения исходного соединения с эквимолярным количеством амина в ледяной уксусной кислоте в течение более 1,5 часов с образованием 3-ариламинопроизводных:



$R_1 = \text{H}, 4\text{-Br}, 4\text{-Cl}, 4\text{-NO}_2$ ;  $R_2 = \text{H}, 4\text{-Br}, 4\text{-F}, 4\text{-CH}_3\text{O}$ ;  $R_3 = \text{H}, 4\text{-CH}_3, 3\text{-CH}_3, 2\text{-CH}_3, 4\text{-CH}_3\text{O}, 4\text{-C}_2\text{H}_5\text{O}$ ;  $n = 1, 2, 3, 5$

Обнаружено, что в реакциях 1-замещенных 5-арил-4-ацетил-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов с ароматическими аминами атака нуклеофильного реагента направлена на карбонильную группу ацетильного фрагмента, более реакционноспособную, чем бензоильная, вследствие

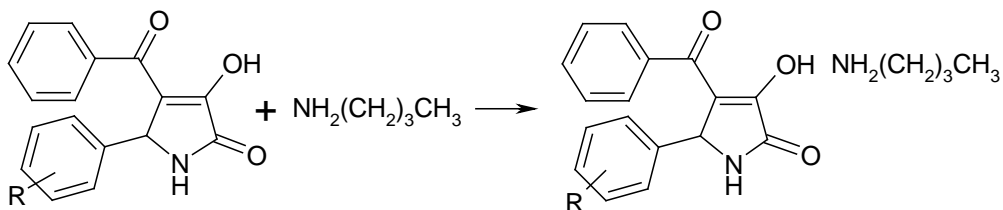
отсутствия сопряжения с ароматическим кольцом. Кипячение реагентов в ледяной уксусной кислоте приводит к образованию в качестве единственного продукта 1-замещенных 5-арил-4-(1-ариламиноэтилиден) тетрагидропиррол-2,3-дионов.



$R^1 = \text{H}, 4\text{-Br}, 4\text{-NO}_2$ ;  $R^2 = \text{H}, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}, \text{CH}_2\text{CONH}_2, (\text{CH}_2)_5\text{COOH}$ ;  $R^3 = 4\text{-Br}, 4\text{-CH}_3, 4\text{-CH}_3\text{O}, \text{H}$

### Взаимодействие 1-замещенных 5-арил-4-ацил-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов с алифатическими аминами

Установлено, что при взаимодействии эквимольных количеств 5-арил-4-бензоил-3-гидрокси-1H-3-пирролин-2-онов и н-бутиламина при кипячении в ледяной уксусной кислоте образуются с небольшим выходом соответствующие аддукты:

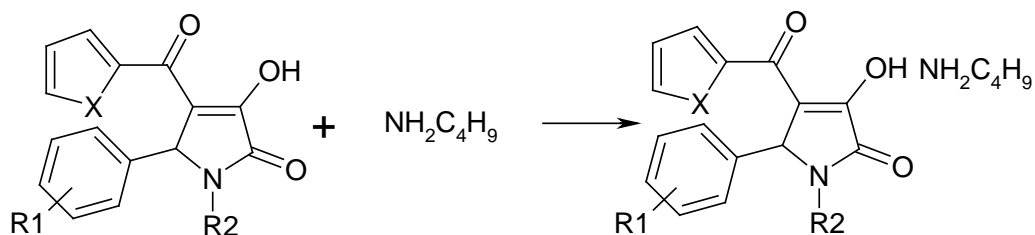


$R = 4\text{-Br}; 4\text{-CH}_3\text{O}$

Образование солей авторы объясняют более высокой основностью алифатических аминов по сравнению с ароматическими аминами. Выход продуктов существенно повышается и приближается к количественному при проведении реакции в диоксане при комнатной температуре.

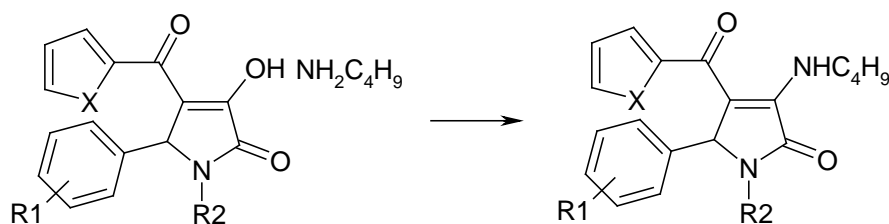
Соединения дают положительную реакцию со спиртовым раствором железа(III) хлорида, что доказывает наличие свободной енольной гидроксильной группы в положении 3 гетероцикла.

При замене бензоильного радикала в 4 положении цикла на гетероильный заместитель образуются аналогичные продукты:



$R^1=4-(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ , H, 4-Cl, 3- $\text{NO}_2$ , 4-F, 4-Br;  $R^2=\text{C}_6\text{H}_5$ , 4- $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_5$ , 2-тиазолил, 3- $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_5$ ; X=O, S.

Установлено, что при нагревании полученных солей 1,5-диарил-4-гетероил-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов и н-бутиламина на металлической бане при температуре 170-200 °С происходит образование 1,5-диарил-3-бутиламино-4-гетероил-3-пирролин-2-онов.



$R^1=\text{H}$ , 4-Cl, 3- $\text{NO}_2$ , 4-F, 4-Br;  $R^2=\text{H}$ , 4- $\text{CH}_3$ , 2-тиазолил; X=O, S.

В отличие от исходных солей они не дают вишневого окрашивания со спиртовым раствором железа(III) хлорида, что подтверждает образование 3-ариламинопроизводных, которые в соответствии с данными спектров существуют в енаминной форме.

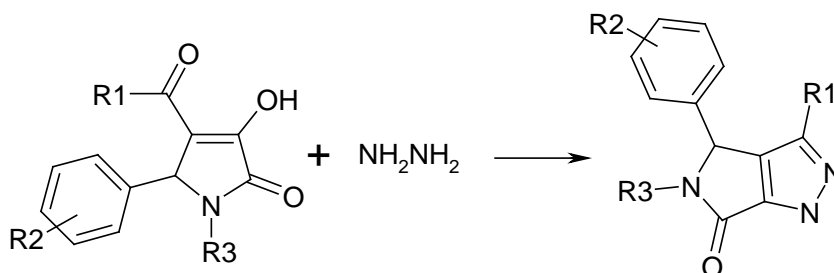
### 1.3.2. Взаимодействие с бинуклеофильными реагентами.

Взаимодействие пирролидин-2-онов с бинуклеофильными реагентами, такими как гидразин, фенилгидразин, орто-фенилендиамин, этилендиамин,

приводит к образованию различных конденсированных гетероциклических систем. [16, 23, 26, 92, 113].

### Взаимодействие 1-замещенных 5-арил-4-ацил-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов с гидразином.

Реакция протекает при кипячении реагентов в ледяной уксусной кислоте с образованием 5-замещенных 4-арил-3-метил- или 3,4-диарилпирроло[3,4-с]пиразол-6-онов.



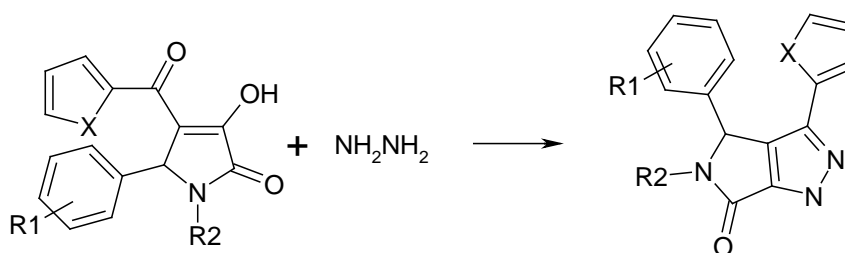
$R^1 = C_6H_5, CH_3, 4-CH_3OC_6H_4, 4-NO_2C_6H_4, 4-ClC_6H_4, 4-BrC_6H_4;$

$R^2 = H, 4-CH_3O, 4-NO_2, 4-Br, 3-CH_3O; 4-OH; 2,4-(CH_3O)_2,$  и др;

$R^3 = H, CH_3, C_3H_7, CH_2COOH, (CH_2)_5COOH, 2\text{-пиридил}, 2\text{-тиазолил}.$

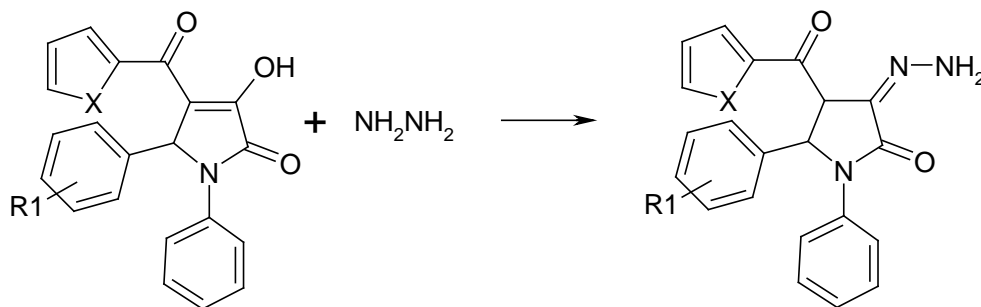
Авторы предполагают, что реакция протекает в 2 стадии: сначала образуется соответствующий гидразон, который затем циклизуется в конденсированную систему пирроло[3,4-с]пиразола.

Введение в 4 положение гетероцикла гетероильного заместителя не влияет на течение реакции: образуются замещенные 3-(2-тиенил)(2-фурил)-пирроло[3,4-с]пиразолы.



$R^1 = H, 3-NO_2, 2,4-Cl; R^2 = C_6H_5, H; X = O, S.$

При проведении реакции в других условиях были получены соответствующие гидразоны. Так при выдерживании смеси исходных 4-гетероил-3-пирролин-2-онов с гидразингидратом в диоксане при комнатной температуре в течение 24 часов были выделены 3-гидразоны 5-арил-4-гетероил-1-фенил-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов.

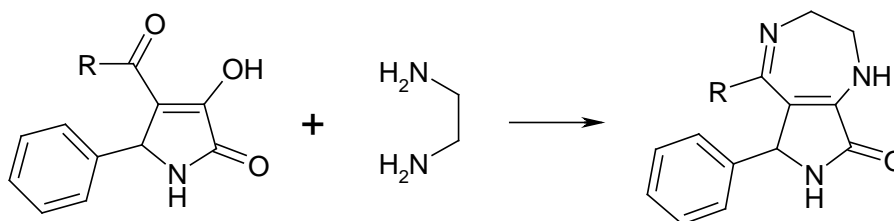


$R^1=4-(\text{CH}_3)_2\text{CH}, \text{H}; \text{X}=\text{S}, \text{O}.$

Таким образом, установлено, что реакция 5-арил-4-гетероил-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов с гидразингидратом при комнатной температуре идет с образованием 3-гидразонов, а при кипячении реагентов в условиях кислотного катализа приводит к гетероциклической системе пирроло[3,4-с]пиразола.

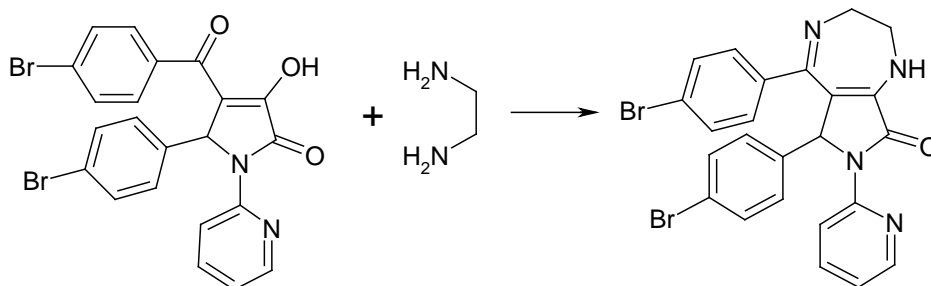
### Взаимодействие 5-арил-4-ацил-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов с этилендиамином

5-Арил-4-ацил-3-гидрокси-1H-3-пирролин-2-оны с этилендиамином в условиях кипячения в диоксане образуют 5-метил- и 5-фенил-8-оксо-6-фенил-6H-пирроло[3,4-f]1H,7H-2,3-дигидро-1,4-дiazепины.



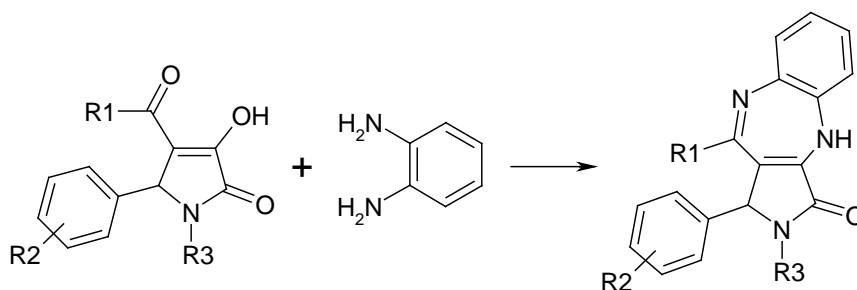
$R=\text{CH}_3, \text{C}_6\text{H}_5.$

При изучении взаимодействия 4-ацил-3-гидрокси-1-(2-гетерил)-3-пирролин-2-онов с этилендиамином в условиях длительного кипячения в диоксане лишь в единичном случае был получен 5,6-ди(4-бромфенил)-8-оксо-7-(2-пиридил)-6Н-пирроло[3,4-f]1Н-2,3-дигидро-1,4-дiazепин.



### Взаимодействие 5-арил-4-ацил-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов с орто-фенилендиамином.

При взаимодействии 5-арил-4-ацетил-3-гидрокси-1Н-3-пирролин-2-онов с орто-фенилендиамином в условиях длительного кипячения в этаноле, с добавлением каталитических количеств ледяной уксусной кислоты образуются 6-арил-5-метил-8-оксо-6Н-пирроло[3,4-f]1Н,7Н-2,3-дигидро-1,4-бензодиазепины. Реакция 3-гидрокси-3-пирролин-2онов, содержащих гетерильный остаток в 1 положении гетероцикла, протекает при длительном кипячении в ледяной уксусной кислоте с образованием 6-арил-5-метил- или 5,6-диарил-8-оксо-6Н-пирроло[3,4-f]1Н,7-(2-гетерил)-2,3-дигидро-1,4-бензодиазепинов.

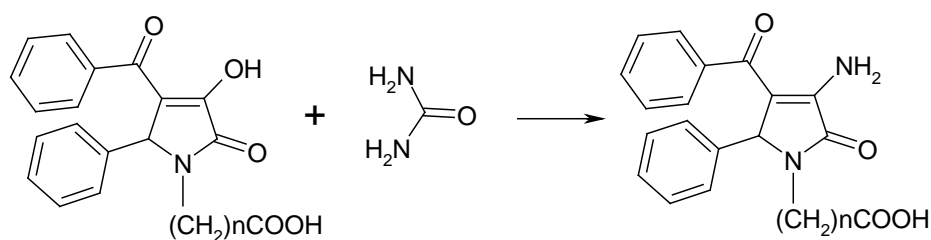


$R^1 = \text{CH}_3, 4\text{-ClC}_6\text{H}_4, 4\text{-BrC}_6\text{H}_4$ ;  $R^2 = \text{H}, 4\text{-CH}_3\text{O}, 4\text{-NO}_2, 4\text{-BrC}_6\text{H}_4$ ;  $R^3 = \text{H}, 2\text{-пиридил}$ .

5-Арил-4-бензоил-3-гидрокси-1Н-3-пирролин-2-оны с орто-фенилендиамином в аналогичных условиях не реагируют, возможно, за счет большей стабильности карбонильной группы бензоильного фрагмента вследствие ее сопряжения с ароматическим кольцом.

### Взаимодействие 5-арил-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов с мочевиной.

При взаимодействии мочевины с 3-пирролин-2-онами, содержащими в положении 1 гетероцикла карбоксиалкильный, а в положении 4 - бензоильный заместители, на металлической бане при температуре 170-180 °С, образуются 3-амино-4-бензоил-1-карбоксиалкил-5-фенил-3-пирролин-2-оны. Такую структуру полученных продуктов авторы объясняют разложением мочевины в условиях проведения реакции до аммиака, который затем взаимодействует с пирролин-2-оном.



$n = 1, 2, 3, 5$

Все полученные соединения (раздел 1.3) представляют собой бесцветные или (реже) окрашенные в желтый цвет кристаллические вещества; не растворимые в воде, хорошо растворимые в диметилформамиде, диметилсульфоксиде, ледяной уксусной кислоте, а при нагревании в спиртах, диоксане, толуоле; с высокими температурами плавления.

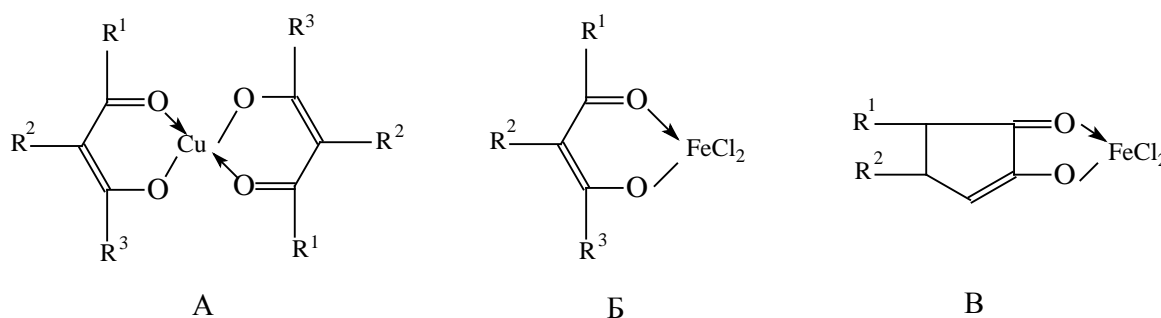
### 1. 4. Методы анализа соединений, содержащих енольную гидроксильную группу

**Подлинность.** 1. Реакции этерификации (ацилирования) [31, 83]. В качестве реагентов применяют хлорангидриды и ангидриды кислот. Из них для

аналитических целей чаще используют уксусный ангидрид, ацетилхлорид, бензоилхлорид, 3,5-динитробензоил хлорид и др. Реакция протекает в среде органических растворителей (пиридин, хлороформ, бензол, эфир), в течение 1-2 ч, часто при нагревании.

2. Реакции с эфирами изоциановой кислоты (фенилизотиоцианат и др.) [31]. Проводятся в присутствии токсичных органических реагентов (бензол, цианиды).

3. Енольная гидроксильная группа может участвовать в образовании хелатного цикла при взаимодействии с солями железа, меди, алюминия и других металлов. Продукты реакций представляют собой либо подлинные внутрикомплексные соединения (А) либо соли (Б, В) этих соединений [31]:



Характерной реакцией подлинности для соединений с енольным гидроксильным является реакция с железом(III) хлоридом [3, 31, 83, 90]. При простом смешении растворов образуются окрашенные комплексные соединения железа(III), соответствующие структурам Б и В. Реакцию проводят в спиртовых (метанольных, этанольных) или водных растворах. Обычно окраски продуктов реакций устойчивы; они немного бледнеют только при подкислении минеральными кислотами. Железа(III) хлорид благоприятствует енолизации соединения [31].

Для подтверждения подлинности енолов также используют реакцию с медью(II) сульфатом, которая чаще проводится с натриевой солью соединения [78, 83, 90].



Известна чувствительная реакция с ртути(I) нитратом, основанная на восстановлении ртути(I) до металлической под действием енольной группы; образуется серый осадок мелко дисперсной ртути [31].

**Количественное определение.** 1. Алкалиметрический метод нейтрализации. Енольные соединения обладают слабым кислотным характером [125]. В некоторых неводных средах их можно титровать непосредственно как кислоты. Наилучшими растворителями для указанных соединений являются пиридин, диметилформамид, ацетон, этилендиамин. В качестве титрантов используют метанольные растворы калия гидроксида или калия метилата; раствор тетрабутиламмония гидроксида или натрия метилата в смеси бензола и метанола [33, 93]. Удовлетворительные результаты получены при титровании лекарственных средств, содержащих в своей структуре енольный гидроксил, водным раствором натрия гидроксида [3, 53, 78, 83, 127].

2. Бромометрический метод. Основан на свойстве енолов (в кето-форме) реагировать со спиртовым раствором брома. Протекает реакция электрофильного замещения водорода у соседнего углеродного атома на бром [31, 78].

3. Йодхлорметрический метод. Предложен для определения бутадиона. В основе лежит реакция электрофильного замещения атома водорода на йод [3, 53, 78].

4. Спектрофотометрия в видимой области спектра. Для получения окрашенных продуктов используют реакции с солями железа(III) и меди(II) [49, 88, 90, 124, 137]. Методики отличаются достаточной точностью, экономичностью, быстротой проведения анализа; не требуют токсичных реагентов.

### 1.5. Спектрофотометрия в видимой области спектра в анализе лекарственных средств

Широкое применение метода связано с достаточной точностью измерений на современных спектрофотометрах и фотоэлектроколориметрах, позволяющих проводить измерения в монохроматическом свете.

Спектрофотометрию достаточно часто используют для определения примеси 4-аминофенола в парацетамоле. В качестве цветореагентов предложены: 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуроксан в мицелярных водно-диметилсульфоксидных средах на основе неионогенных ПАВ [98]; п-диметиламинокоричный альдегид [34]; 4-хлор-5,7-динитробензофуразан или 7-хлор-4,6-динитробензофуроксан [95]. Методики позволяют определять 4-аминофенол в парацетамоле на уровне более низком, чем его предельно допустимое содержание, сравнительно просты в исполнении.

Предельное содержание салициловой кислоты в субстанции и таблетках ацетилсалициловой кислоты устанавливают фотометрическим методом. Для получения окрашенных продуктов используют реакцию с солями железа(III) [104]. Методика проста в исполнении, дает достаточно точные результаты, не требует сложной аппаратуры.

В растворимых натриевых и кальциевых солях ацетилсалициловой кислоты действующее вещество предложено анализировать фотоколориметрическим методом, после щелочного гидролиза. Продукт гидролиза - салициловая кислота – вовлекается в реакцию с цветореагентом (железо-аммониевые квасцы) [84].

Известны методики спектрофотометрического определения парацетамола в фармацевтических и биологических образцах; для получения окрашенных продуктов применяют натрия нитропруссид [49, 155]; пирокатехиновый фиолетовый в щелочной среде [136], соли железа(III) [135].

А.А. Mustapha разработан метод анализа ацикловира и амантадина гидрохлорида в субстанциях и в фармацевтических препаратах, основанный на реакциях образования окрашенных комплексов указанных веществ с

металлами. Ацикловир определяли по реакции с медью(II) и кобальтом(II) в боратном буферном растворе с рН 9 и в неводной среде (1% раствор пиридина в метаноле); амантадина гидрохлорид - по реакции с железом(III) при рН 3 (0,1 М NH<sub>3</sub>). Достоверность разработанных методик подтверждали методом добавок [158].

Реакции комплексообразования с солями железа(III) использованы для определения пироксикама в лекарственных препаратах [88, 124, 128, 137]; имипрамин образует устойчивые окрашенные комплексы с Fe(III) - SCN ионами [156].

Описан спектрофотометрический метод анализа пенициллиновых антибиотиков (ампициллина, амоксициллина и карбенициллина) с применением реактива Фолина-Чокальтеу (ФЧ). Смесь определяемых соединений с ФЧ-реактивом при рН ~2,25 нагревают при 95±2°C; интенсивность окраски образующихся гетерополисоединений измеряют при длинах волн, специфических для каждого из определяемых антибиотиков. Точность методики оценена повторным анализом 10 проб указанных пенициллинов с известной концентрацией. Предложенный метод использован для анализа субстанций и фармацевтических препаратов. [159].

Разработана (Zh. Shah) методика спектрофотометрического определения метоклопрамида в лекарственных препаратах, основанная на реакции диазотирования натрия нитритом с последующей реакцией азосочетания с анилином. Оптическую плотность измеряют при 410 нм. Найдены оптимальные условия реакции по кислотности, количеству реагентов и NaOH. Закон Бера выполняется в интервале 0,5-12,0 мкг/мл. Использование обычных наполнителей не мешает определению [162].

К.С. Кумар с сотрудниками предложены простые и чувствительные спектрофотометрические методики определения карбофурана в его препаратах и в объектах окружающей среды. В основе лежат реакции азосочетания между продуктом гидролиза карбофурана и диазотированными

реагентами (2,6-дибром-4-метиланилином или 2,6-дибром-4-нитроанилином) [54].

Описан простой, чувствительный и селективный кинетический спектрофотометрический метод определения канамицина в субстанции и в фармацевтических препаратах. Методика основана на измерении интенсивности поглощения при 410 нм продукта реакции канамицина с ацетилацетон-формальдегидным реагентом в среде диметилформамида. Проведена валидация методики по показателям линейность, сходимость (повторяемость), воспроизводимость, правильность результатов [31].

Для определения прометаина гидрохлорида Б.Г. Говда использованы реакции с сульфаниловой кислотой в присутствии N-бромсукцинимиды или с 4-нитроанилином в присутствии сульфата церия(IV). Максимумы поглощения продуктов реакций находятся соответственно при 600 и 510 нм. Разработаны простые, быстрые и селективные спектрофотометрические методики анализа прометаина в субстанции и фармацевтических препаратах [161].

Реакция с нингидрином положена в основу количественного определения лекарственных средств из группы алифатических аминов: алифатических аминокислот [79], аминалона [41], фенибута [12, 47], салифена [8], глицина [7], таурина [126], лизиноприла [138, 150, 153, 160].

Разработан (Ramech K.S.) чувствительный косвенный спектрофлуориметрический метод определения пироксикама и пропранолола гидрохлорида в субстанциях и фармацевтических препаратах. Метод основан на окислении указанных соединений известным избыточным количеством N-бромсукцинимиды и последующем взаимодействии избытка этого реагента с метдилазина гидрохлоридом с образованием флуоресцирующих продуктов. Интенсивность флуоресценции (при 377 нм) линейно убывает с увеличением концентрации пироксикама и пропранолола гидрохлорида в интервалах 0,2-8,0 мкг/мл и 0,4-18,0 мкг/мл соответственно. Обычные наполнители и добавки не мешают определению [147].

С.В.М. Мохан Рао с сотрудниками предложены три методики определения содержания мезилата нелфинавира (НЕЛ) в субстанции и в лекарственных препаратах методом спектрофотометрии в видимой области. Методики основаны на окислении НЕЛ избытком окислителя в кислой среде. В качестве окислителей использовали N-бромсукцинимид или хлорамин Т. Методики дают воспроизводимые результаты. Мера правильности составляет 99,3-100,5% [163].

Предложены методики спектрофотометрического определения аскорбиновой кислоты в фармацевтических препаратах, основанные на реакции с аммиачным комплексом меди(II). В этой реакции аскорбиновая кислота окисляется, а аммиачный комплекс меди(II) восстанавливается до аммиачного комплекса меди(I), после чего измеряют уменьшение светопоглощения при 600 нм (максимум поглощения аммиачного комплекса меди(II)). Методики использованы для определения витамина С в различных фармацевтических препаратах - поливитаминных таблетках и сиропах, таблетках и порошках витамина С, шипучих таблетках. Полученные результаты хорошо согласуются с данными, полученными йодометрическим методом [52, 105].

А.В. Булатовым с сотрудниками разработана методика циклического инъекционного фотометрического определения аскорбиновой кислоты в лекарственных препаратах, основанной на сочетании высокоселективной и быстрой реакции аскорбиновой кислоты с новым реагентом - гуанидиниевой солью 11-молибдовисмутофосфорной гетерополикислоты и циклического инъекционного анализа [110].

Описана методика спектрофотометрического определения допамина, основанная на его бромировании избытком раствора бромирующей смеси. После бромирования вводят иодид калия; при этом раствор окрашивается в желтый цвет. Оптическую плотность этого раствора измеряют при 350 нм [97].

Ивановым В.М с сотрудниками рассмотрена возможность применения 1,2-дигидроксиантрахинон-3-сульфоокислоты (ализаринового красного С) в качестве цветореагента при экстракционно-фотометрическом определении органических оснований (новокаин, лидокаин). Приведены спектрофотометрические характеристики полученных ионных ассоциатов [37].

Х.А. Мирзаевой экстракционно-фотометрическим методом исследовано взаимодействие димедрола и папаверина с сульфоназо. Установлено образование малорастворимых ионных ассоциатов, хорошо экстрагируемых бутанолом; найдены оптимальные условия их образования и экстракции. Разработаны методики экстракционно-фотометрического определения димедрола и папаверина, которые применены к анализу лекарственных препаратов и отличаются достаточными чувствительностью, экспрессностью и избирательностью [120]. Для определения димедрола также предложена методика безэкстракционного определения; ионный ассоциат получают с молибденом(VI) и бромпирогаллоловым красным в присутствии неионогенного ПАВ [96].

М.В. Гаврилыным с сотрудниками выбраны оптимальные условия анализа триметилгектадецил аммония бромида в препарате «Бактерицид» методом экстракционной фотометрии. Установлены оптимальные условия образования ионного ассоциата действующего вещества с бромкрезоловым пурпуровым [121].

Показана возможность спектрофотометрического определения пироксикама на основе экстракции его ионного ассоциата с полиметиновым красителем. Методика использована для контроля качества фармацевтических препаратов, содержащих пироксикам [21, 48].

## ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1

1. На сегодняшний день ноотропные препараты являются динамично развивающейся группой лекарственных средств. Ноотропы первого поколения – рацетамы – прочно зарекомендовали себя в медицине и лидируют в списке ноотропных средств. Все известные ноотропы не лишены недостатков, поэтому постоянно ведётся поиск новых биологически активных соединений, обладающих мнемотропным действием, которые по структуре походили бы на рацетамы, но превосходили бы их по активности.

2. С целью получения потенциально биологически активных соединений, обладающих в т.ч. и ноотропным действием, осуществлен синтез пирролинонов, содержащих в положении 1 различным образом функционализированный заместитель. Исследования показали, что среди 1,4,5-тризамещенных 3-гидрокси-3-пирролин-2-онов обнаружены вещества, обладающие ноотропной активностью.

3. 4,5-Дизамещенные 3-гидрокси-3-пирролин-2-оны содержат несколько реакционных центров; взаимодействуют с различными моноклеофильными и бинуклеофильными реагентами. Для получения продуктов реакций необходимы жесткие условия: кипячение исходного соединения с реагентом в ледяной уксусной кислоте в течение более 1,5 часов; проведение реакции в диоксане при комнатной температуре в течение 24 часов или в условиях длительного кипячения; нагревание реагентов на металлической бане при температуре 170-200 °С. Это не позволяет использовать указанные реакции в фармацевтическом анализе.

Многие производные 3-гидрокси-3-пирролин-2-она дают положительную реакцию со спиртовым раствором железа(III) хлорида, что доказывает наличие свободной енольной гидроксильной группы в положении 3 гетероцикла.

4. Для подтверждения подлинности соединений, содержащих енольную гидроксильную группу, наибольший интерес представляют реакции комплексообразования с солями железа(III) и меди (II). Из методов

количественного определения перспективными являются алкалиметрический метод нейтрализации и спектрофотометрия в видимой области спектра.

5. Анализ литературных данных показал, что спектрофотометрия в видимой области спектра в настоящее время широко применяется в фармацевтическом анализе, как для количественного определения лекарственных средств, так и при исследовании их на доброкачественность. Методики, как правило, отличаются достаточной точностью, чувствительностью, экспрессностью, избирательностью и экономичностью.



## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 2.1. Характеристика объектов, вспомогательных материалов, оборудования и реактивов

КОН-1 - 4-ацетил-5-(4-бромфенил)-3-гидрокси-1-(3-гидроксипропил)-3-пирролин-2-он: 7 опытных серий получены на кафедре физической и коллоидной химии под руководством профессора Гейна В.Л. [23, 26] по схеме 2:

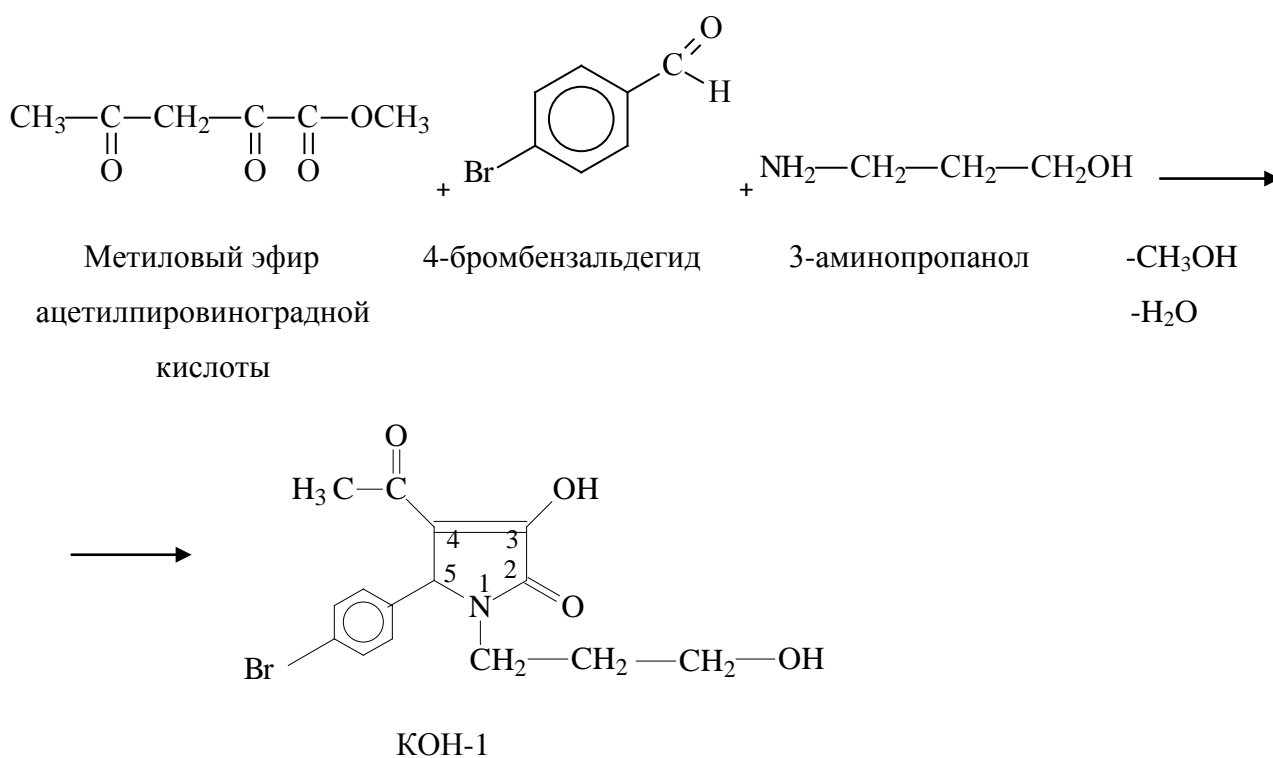


Схема 2 – Синтез субстанции 4-ацетил-5-(4-бромфенил)-3-гидрокси-1-(3-гидроксипропил)-3-пирролин-2-он ( КОН-1)



М.м. 354,20

Все исследования проведены на 5 сериях субстанций: 241109, 100210, 261010, 300311, 270212. Серии субстанции 061209,150410 использовали только при изучении сроков годности КОН-1.

**Оборудование:**

Спектрофотометр СФ-2000.

Хроматограф «Shimadzu LC Prominence», оборудованный колонкой из нержавеющей стали (25см × 4,6мм, сорбент Discovery® C18 5 мкм) и диодноматричным детектором (для ВЭЖХ).

Колориметр фотоэлектрический концентрационный КФК-3-03.

Иономер универсальный ЭВ-74.

Весы аналитические VIBRA AF-R220CE, ВЛА-200г-М.

Цилиндры мерные на 50, 100 мл.

Колбы мерные вместимостью 25, 50, 100 и 250 мл.

Колбы конические вместимости 50, 100, и 250 мл.

Бюретка градуированная на 25 мл.

Пипетки градуированные на 1, 2, 5, 10 и 50 мл.

Пробирки.

**Реактивы и титрованные растворы:**

Реактивы, использованные при разработке методик и титрованные растворы, описаны в ГФ XII или соответствующих главах.

**Приготовление растворов.**

Нингидрина раствор 1% в спирте этиловом 96%. 0,5 г нингидрина растворяют в 25 мл спирта этилового 96% и доводят объем раствора тем же растворителем до 50 мл. Раствор используют свежеприготовленным.

Аскорбиновой кислоты раствор 0,05%. 0,05 г аскорбиновой кислоты растворяют в 50 мл воды очищенной и доводят объём раствора до 100 мл тем же растворителем. Раствор используют свежеприготовленным.

Трифторуксусной кислоты раствор 0,05%. 300 мл воды бидистиллированной помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, прибавляют 0,5 мл трифторуксусной кислоты, перемешивают. Доводят водой до метки.

Фосфатные буферные растворы (рН=6,0-7,4) (ГФ XI, часть 1, стр.114)

Все растворы, используемые как компоненты подвижной фазы в ВЭЖХ, фильтровали через мембранные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм и дегазировали на УЗ – бане в течение 10 мин.

## 2.2. Методы исследования

*Описание.* Раздел составлен в соответствии с требованиями ГФ XII ОФС 42-0074-07 [70].

*Растворимость* субстанции КОН-1 исследовали с учетом требований ГФ XII ОФС 42-0049-07 [63].

*Температуру плавления* КОН-1 определяли капиллярным методом в соответствии с требованиями ГФ XII ОФС 42-0034-07 [59].

*Кислотность и щелочность* определяли согласно требованиям ГФ XII ОФС 42-0074-07 [70].

*Потеря в массе при высушивании.* Исследовали в соответствии с требованиями ОФС 42-0087-08. Около 1,0 г (точную навеску) высушивали в сушильном шкафу при температуре от 100 до 105 °С до постоянной массы [72].

*Хлориды и сульфаты.* Определяли согласно требованиям ОФС 42-0109-09; ОФС 42-0107-09 (метод 1) [65, 67].

*Сульфатную золу и тяжелые металлы* определяли по методикам ГФ XII, ОФС 42-0056-07; ОФС 42-0059-07 (метод 1) [66, 68].

*Прозрачность и степень мутности жидкости* определяли по методикам ГФ XII, ОФС 42-0050-07 [64].

*Потенциометрическое титрование* субстанции КОН-1 проводили на приборе “Иономер универсальный ЭВ-74”. В качестве индикаторного электрода использовали стеклянный, а электрода сравнения - хлорсеребряный.

*Константу ионизации* определяли потенциометрическим методом по известной методике [2] при температуре 20 °С. Расчет  $pK_a$  проводили по

полученным значениям рН с использованием таблиц без учета поправок на концентрацию ионов водорода.

*Анализ методом ВЭЖХ* проводили на базе лаборатории хроматографических методов РИЦ «Фарматест» ПГФА при участии зав. лабораторией доц. Карпенко Ю.Н. (руководитель РИЦ «Фарматест» доц. Малкова Т.Л.). Запись и обработку хроматограмм осуществляли с помощью программы «ChemStation» ОФС 42-0096-09 (для ВЭЖХ) [73].

*Спектры поглощения в ИК области* сняты на ИК-микроскопе IN10 TERMO SCIENTIFIC в соответствии с требованиями ГФ XII ОФС 42-0043-07 [9, 61].

*Спектры поглощения в УФ области* сняты в соответствии с требованиями с ГФ XII ОФС 42-0042-07 [60].

*ЯМР'Н спектры* записаны доц. Вахриным М.И. в соответствии с требованиями ГФ XII ОФС 42-0046-07 [62].

*Валидацию* методик осуществляли в соответствии с требованиями ОФС 42-0113-09 [75].

*Микробиологическую чистоту* определяли на базе кафедры микробиологии ПГФА - зав. кафедрой профессор Одегова Т.Ф. в соответствии требованиями ГФ XII ОФС 42-0067-07 [69].

*Изучение стабильности и определение сроков годности* КОН-1 проводили в соответствии с требованиями ГФ XII ОФС 42-0075-07 [71]. Лабораторные образцы субстанции (5 серий) хранили в банках темного стекла в сухом, защищенном от света месте при температуре  $20 \pm 2$  °С. Через промежутки времени, соответствующие 1 году хранения, определяли показатели качества субстанции по всем показателям проекта ФСП.

*Статистическую обработку* экспериментальных данных проводили с помощью компьютерных программ Excel 2003 (Microsoft Inc., 2003) Statistical, версия 6,0 (StatSoftInc., 2001) в соответствии с ОФС 42-0111-09 [74].

### ГЛАВА 3. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОН-1

Важным этапом исследования нового биологически активного соединения является изучение его физико-химических свойств, на основе которых проводится разработка способов нормирования качества лекарственного средства.

#### 3.1. Физические свойства

**Описание.** По внешнему виду все 7 серий субстанции КОН-1 представляют собой белые мелкокристаллические порошки, без запаха.

**Растворимость.** При определении растворимости использовали растворители разной полярности (с различным значением диэлектрической проницаемости -  $\epsilon$ ), исключая легкокипящие и легковоспламеняющиеся (диэтиловый эфир) или очень токсичные (бензол, метиленхлорид). Результаты исследования представлены в таблице 3.1.

**Таблица 3.1 - Растворимость КОН-1 в некоторых растворителях**

| Растворитель         | $\epsilon$ [99] | Растворимость в частях | Растворимость в терминах ГФ XII |
|----------------------|-----------------|------------------------|---------------------------------|
| Диметилформаид       | 37,60           | 1:10                   | Легко растворим                 |
| Спирт 96%            | 24,30           | 1:25                   | Растворим                       |
| Ацетон               | 20,70           | 1:50                   | Умеренно растворим              |
| 1,4-Диоксан          | 2,95            | 1:300                  | Мало растворим                  |
| Хлороформ            | 4,81            | 1:400                  | Мало растворим                  |
| 1-Бутанол            | 17,10           | 1:500                  | Мало растворим                  |
| Кислота уксусная 30% | 9,50            | 1:700                  | Мало растворим                  |
| Гексан               | 2,22            | 1:более 10000          | Практически не растворим        |
| Вода очищенная       | 78,30           | 1: более 10000         | Практически не растворим        |

Как следует из таблицы 1, растворимость субстанции КОН-1 зависит от природы растворителя: она лучше растворима в полярных органических

растворителях с высоким значением диэлектрической проницаемости ( $\epsilon > 20$ ), практически не растворима в воде.

*Нормативное требование.* Легко растворим в диметилформамиде, растворим в спирте 96%, практически не растворим в воде.

*Температура плавления.* Определение температуры плавления проводили на 5 сериях субстанции КОН-1 капиллярным методом (табл. 3.2). Полученные результаты позволяют нормировать интервал температуры от 212 °С до 214 °С.

**Таблица 3.2 - Результаты определения температура плавления КОН-1**

| Серия  | № опыта | Температура плавления, °С | Среднее значение, °С |
|--------|---------|---------------------------|----------------------|
| 241109 | 1       | 213 - 214                 | 213 - 214            |
|        | 2       | 213 - 214                 |                      |
|        | 3       | 213 - 214                 |                      |
| 100210 | 1       | 212 - 213                 | 212- 213             |
|        | 2       | 212 - 213                 |                      |
|        | 3       | 213 - 214                 |                      |
| 261010 | 1       | 212 - 213                 | 212 - 213            |
|        | 2       | 212 - 213                 |                      |
|        | 3       | 213 - 214                 |                      |
| 300311 | 1       | 212 - 213                 | 213 - 214            |
|        | 2       | 213 - 214                 |                      |
|        | 3       | 213 - 214                 |                      |
| 270212 | 1       | 213 - 214                 | 213- 214             |
|        | 2       | 213 - 214                 |                      |
|        | 3       | 212 - 213                 |                      |

*pH водного раствора.* Для исследования нагревали субстанцию КОН-1 в воде при температуре до 100 °С, охлаждении смесь до 20 °С и фильтровали через бумажный фильтр. У фильтрата измеряли водородный показатель потенциометрическим методом. Опыты проведены на 5 сериях КОН-1. Реакция среды фильтратов, полученных при обработке водой субстанции (5,80; 5,70; 5,65; 5,70; 5,60), свидетельствует об отсутствии в соединении примесей кислотного или основного характера, т.к. сам КОН-1 в воде

практически не растворим. Возможное нормируемое значение pH 5,0-7,0 (как у воды очищенной).

### **3.2. Показатели и нормы качества**

#### **3.2.1. Прозрачность и цветность растворов**

Данные испытания для субстанции КОН-1 не проводятся, т.к. возможной лекарственной формой будут выбраны таблетки или капсулы.

#### **3.2.2. Кислотность или щелочность**

Для проведения данного испытания использован один из подходов, рекомендованный ГФ XII: полуколичественное индикаторное титрование.

*Методика 1.* 1,5 г субстанции КОН-1 помещали в коническую колбу, прибавляли 30 мл воды, свободной от углерода диоксида, перемешивали в течение 15 мин и фильтровали.

К 10 мл фильтрата прибавляли 0,15 мл раствора фенолфталеина и титровали 0,01 М раствором натрия гидроксида до появления розовой окраски ( $V_{\text{NaOH}}$ ). К полученному раствору прибавляли такой же объём 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты до исчезновения розовой окраски; затем добавляли 0,1 мл раствора метилового красного. Раствор окрашивался в жёлтый цвет. Его титровали 0,01 М раствором хлористоводородной кислоты до появления розовой окраски ( $V_{\text{HCl}}$ ).

*Методика 2.* К 10 мл фильтрата (см. методика 1) прибавляли 0,1 мл раствора метилового красного. Раствор окрашивался в жёлтый цвет или розовый цвет. Его титровали 0,01 М раствором хлористоводородной кислоты до появления розовой окраски ( $V_{\text{HCl}}$ ) или 0,01 М раствором натрия гидроксида до появления жёлтой окраски ( $V_{\text{NaOH}}$ ).

Результаты исследования приведены в таблице 3.3.

**Таблица 3.3 – Определение кислотности или щелочности  
субстанции КОН-1 различных серий**

| Серия  | Методика 1             |                       | Методика 2             |                       |
|--------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
|        | V <sub>NaOH</sub> , мл | V <sub>HCl</sub> , мл | V <sub>NaOH</sub> , мл | V <sub>HCl</sub> , мл |
| 241109 | 0,15                   | 0,15                  | 0,10                   | -                     |
| 100210 | 0,10                   | 0,10                  | -                      | 0,10                  |
| 261010 | 0,15                   | 0,15                  | 0,10                   | -                     |
| 300311 | 0,10                   | 0,10                  | -                      | 0,10                  |
| 270212 | 0,10                   | 0,10                  | -                      | 0,10                  |

*Нормативное требование.* 1 г субстанции встряхивают с 20 мл воды, свободной от углерода диоксида, в течение 15 мин, раствор фильтруют. К 10 мл фильтрата прибавляют 0,1 мл раствора метилового красного. Окраска индикатора должна измениться от прибавления не более 0,15 мл 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты или 0,01 М раствора натрия гидроксида.

### 3.2.3. Потеря в массе при высушивании

Содержание летучих веществ и воды во всех сериях субстанции не превышает 0,5% (табл. 4). Это значение введено в проект ФСП.

Гигроскопичность КОН-1 определяли путем хранения субстанции, предварительно высушенной до постоянной массы, в открытом бюксе при относительной влажности воздуха 60 - 80 % в течение 10 дней. Потеря в массе при высушивании после хранения составила от 0,02 % до 0,05 % (табл.3.4). Субстанция практически не поглощает влагу; при этом её качество по показателю «Описание» по сравнению с исходными образцами не изменяется. Субстанция КОН-1 не гигроскопична.



**Таблица 3.4 - Определение потери в массе при высушивании субстанции  
КОН-1**

| Серия  | Потеря в массе при высушивании, %       |   |
|--------|---|---|
|        | При определении нормативного показателя | При определении гигроскопичности субстанции |
| 241109 | 0,150; 0,170; 0,180                     | 0,03; 0,04; 0,04                            |
| 100210 | 0,130; 0,150; 0,160                     | 0,03; 0,04; 0,05                            |
| 261010 | 0,095; 0,100; 0,085                     | 0,04; 0,04; 0,05                            |
| 300311 | 0,080; 0,085; 0,090;                    | 0,02; 0,02; 0,03                            |
| 270212 | 0,080; 0,110; 0,080                     | 0,03; 0,03; 0,04                            |

### 3.2.4. Хлориды и сульфаты

*Методика.* Навеску субстанции КОН-1 (от 0,2 до 1,5 г) взбалтывали с 30 мл воды в течение 10 мин и фильтровали через двойной бумажный фильтр, отбрасывая первые 5 мл фильтрата. С 10 мл фильтрата проводили испытания на хлориды и сульфаты. Исследования проведены на серии КОН-1 241109 (табл. 3.5). Концентрация примесей в эталонных растворах: хлориды – 0,0002%; сульфаты – 0,001%.

**Таблица 3.5 - Определение примесей хлоридов и сульфатов в КОН-1**

| Навеска субстанции КОН-1, г | Хлориды               |   | Сульфаты              |   |
|-----------------------------|-----------------------|---|-----------------------|---|
|                             | Результат определения | Соответствие содержанию в субстанции, % | Результат определения | Соответствие содержанию в субстанции, % |
| 1,5                         | +                     | 0,0040                                  | +                     | 0,0200                                  |
| 1,2                         | +                     | 0,0050                                  | +                     | 0,0250                                  |
| 1,0                         | +                     | 0,0060                                  | +                     | 0,0300                                  |
| 0,8                         | -                     | 0,0075                                  | -                     | 0,0375                                  |
| 0,6                         | -                     | 0,0100                                  | -                     | 0,0500                                  |
| 0,4                         | -                     | 0,0150                                  | -                     | 0,0750                                  |
| 0,2                         | -                     | 0,0300                                  | -                     | 0,1500                                  |

Примечание. + Примесь обнаружена; - примесь не обнаружена.

Полученные данные позволяют нормировать содержание примесей в субстанции КОН-1 в пределах: хлориды - не более 0,01%; сульфаты - не более 0,05% [44].

*Нормативное требование. Хлориды.* 0,6 г субстанции взбалтывают с 30 мл воды в течение 10 мин и фильтруют через двойной бумажный фильтр, отбрасывая первые 5 мл фильтрата. 10 мл фильтрата должны выдерживать испытание на хлориды (не более 0,01% в субстанции).

**Сульфаты.** 10 мл фильтрата, полученного в испытании на хлориды, должны выдерживать испытание на сульфаты (не более 0,05% в субстанции).

Исследование 5 серий субстанции КОН-1 на предельное содержание хлоридов и сульфатов показало их соответствие указанным показателям (табл. 3.6).

**Таблица 3.6 - Содержание примесей хлоридов и сульфатов в различных сериях субстанции КОН-1**

| Серия  | Примесь              |                      |
|--------|----------------------|----------------------|
|        | Хлориды              | Сульфаты             |
| 241109 | Не превышает эталона | Не превышает эталона |
| 100210 | Не превышает эталона | Не превышает эталона |
| 261010 | Не превышает эталона | Не превышает эталона |
| 300311 | Не превышает эталона | Не превышает эталона |
| 270212 | Не превышает эталона | Не превышает эталона |

### 3.2.5. Сульфатная зола и тяжелые металлы

Исследования показали, что масса сульфатной золы из 1 г субстанции во всех опытах не превышает 0,1%; все серии субстанции выдерживают испытания на тяжелые металлы в сравнении с эталоном (не более 0,001% в субстанции).

### 3.3. Спектральные характеристики

В целях всестороннего изучения свойств 4-ацетил-5-(4-бромфенил)-3-гидрокси-1-(3-гидроксипропил)-3-пирролин-2-она были получены и проанализированы его УФ-, ИК- и ЯМР  $^1\text{H}$ - спектры, исследована возможность использования полученных данных для разработки методик оценки качества субстанции КОН-1.

#### 3.3.1. ИК-спектрофотометрия

Метод ИК-спектрофотометрии является приоритетным при идентификации субстанций, т.к. совокупность всех полос поглощения инфракрасного спектра соединения характеризует его индивидуальность [61, 70].

В ИК-спектре, снятом на ИК-микроскопе IN10 TERMO SCIENTIFIC, присутствуют полосы поглощения лактамной карбонильной группы при  $1688 - 1696 \text{ см}^{-1}$ , кетонной карбонильной группы при  $1666 - 1676 \text{ см}^{-1}$ , углерод-углеродной связи при  $1627 \text{ см}^{-1}$ , гидроксильной группы при  $3110 - 3120 \text{ см}^{-1}$ . (рис. 3.1) [9, 76].

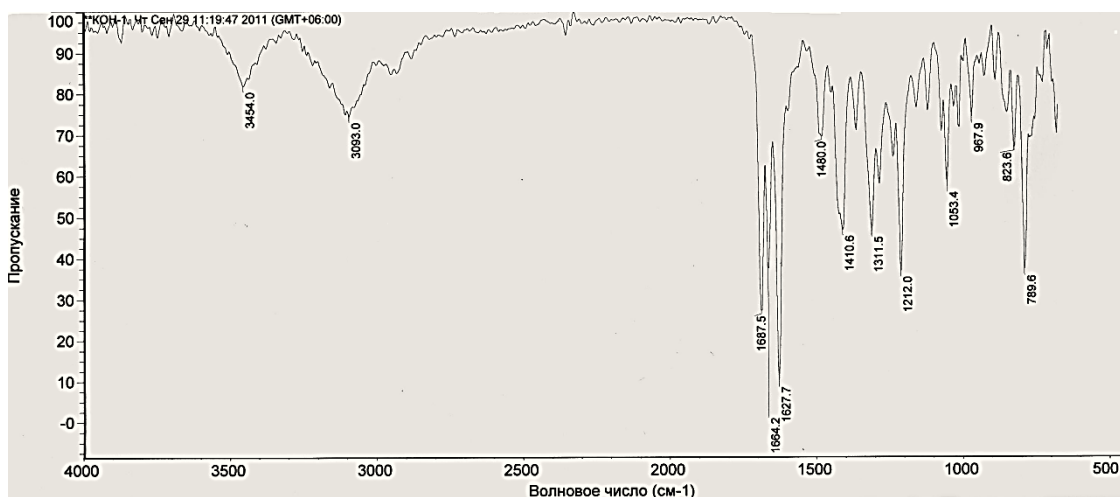


Рисунок 3.1 - ИК-спектр КОН-1.

*Нормативное требование. Подлинность.* Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области от  $4000 \text{ до } 400 \text{ см}^{-1}$

по положению полос поглощения должен соответствовать рисунку спектра КОН-1.

В качестве стандарта использована субстанция КОН-1, отвечающая требованиям ФСП, с содержанием действующего вещества не менее 99,8%.

### 3.3.2. УФ-спектрофотометрия

Изучено поглощение КОН-1 в спирте 96%, в 0,01 М растворах хлористоводородной кислоты и натрия гидроксида. Спектры снимали в области от 220 до 400 нм. При взаимодействии КОН-1 с натрия гидроксидом образуется соль по енольной гидроксильной группе. Натриевая соль растворима в воде. УФ-спектры соединения (спектрофотометр УФ-2000; 0,001% растворы) в нейтральном растворителе (спирт 96%) и 0,01 М растворе натрия гидроксида (рН 12) имеют один четко выраженный максимум поглощения при  $328 \pm 2$  нм, минимум – при  $283 \pm 2$  нм (рис 3.2 и 3.3). Величина отношения поглощения в максимуме к поглощению в минимуме ( $E_{\text{макс}} / E_{\text{мин}}$ ) составляет 4,5. В 0,01М растворе хлористоводородной кислоты наблюдается гипсохромный сдвиг поглощения КОН-1 в область 230 - 260 нм - «плечо»; при этом отсутствуют выраженные экстремумы поглощения (рис. 3.4). Это позволяет сделать заключение, что поглощение КОН-1 в УФ области обусловлено электронными переходами внутри пирролинового цикла; изменение положения максимума поглощения в нейтральной и щелочной средах обусловлено ионизацией енольной гидроксильной группы [10, 40].

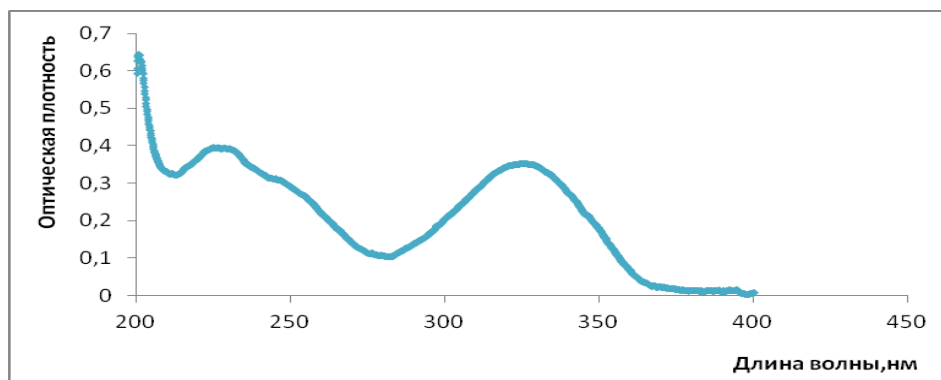


Рисунок 3.2 - УФ-спектр 0,001 % спиртового раствора КОН-1

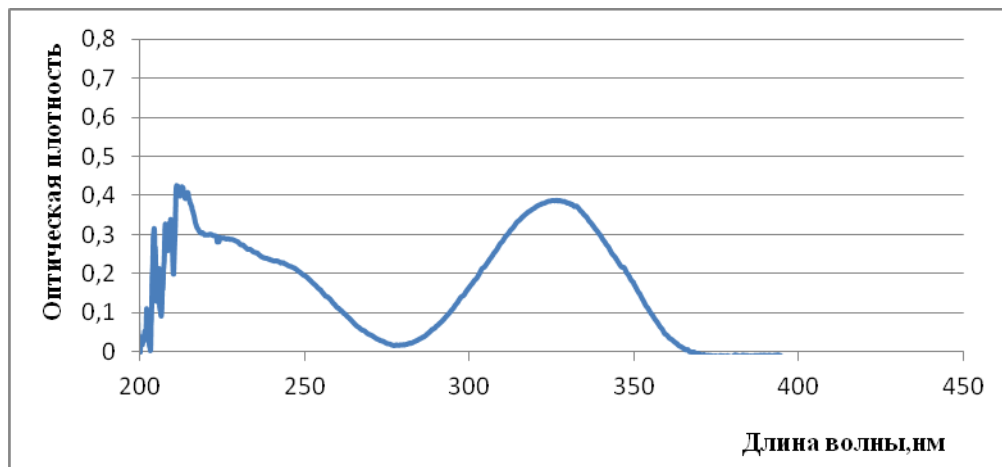


Рисунок 3.3 - УФ-спектр 0,001 % раствора КОН-1 в 0,01 М NaOH

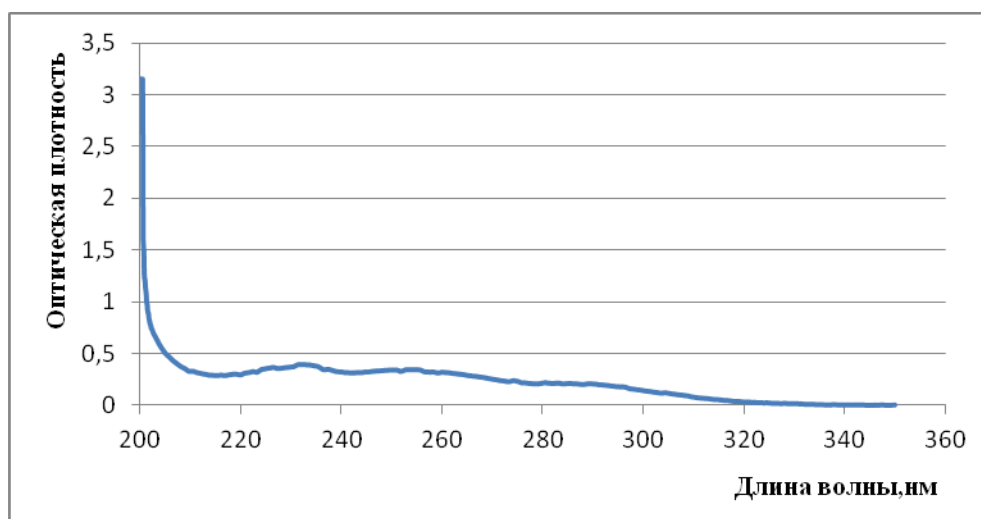


Рисунок 3.4 - УФ-спектр 0,001 % раствора КОН-1 в 0,01 М HCl

По УФ-спектрам КОН-1 нами рассчитаны оптические характеристики (табл. 3.7): удельный ( $E_{1cm}^{1\%}$ ) и молярный ( $\epsilon$ ) показатели поглощения, полуширина полосы поглощения ( $\Delta\nu^{1/2}$ ), фактор асимметрии ( $\rho$ ), интегральная интенсивность полосы поглощения ( $\int_0^{\infty} \epsilon(\nu) d\nu$ ), сила осциллятора ( $f$ ), момент электронного перехода ( $\mu$ ), которые дают более

полное представление о спектрах поглощения и позволяют различать вещества с близкой химической структурой [14, 91, 94,].

**Таблица 3.7 - Оптические характеристики УФ-спектров поглощения  
КОН-1**

| Среда       | $\lambda$<br>max,<br>нм | $\nu$<br>max,<br>$\text{см}^{-1}$ | $E^{1\%}_{1\text{см}}$ | $\epsilon$ | $\Delta\nu_{1/2}$<br>( $\text{см}^{-1}$ ) | $\rho$ | $\int_0^{\infty} \epsilon(\nu) d\nu$<br>$\cdot 10^{-8}$ | $f$   | $\mu \cdot 10^9$ |
|-------------|-------------------------|-----------------------------------|------------------------|------------|---|--------|---|-------|------------------|
| Щелочная    | 213                     | 46948                             | 348                    | 12326      | -   | -      | -   | -     |                  |
|             | 328                     | 30488                             | 384                    | 13601      | 4377                                      | 0,668  | 0,633   | 0,273 | 9,08             |
| Нейтральная | 328                     | 30488                             | 366                    | 12964      | 4077                                      | 0,694  | 0,562   | 0,243 | 8,57             |
| Кислая      | 200                     | 50000                             | 649                    | 22987      | -   | -      | -   | -     |                  |
|             | 233                     | 42918                             | 377                    | 13353      | -   | -      | -   | -     |                  |
|             | 254                     | 39370                             | 343                    | 12149      | -   | -      | -   | -     |                  |

КОН-1, как и большинство органических соединений, в растворах обнаруживает широкие полосы поглощения. Уширение полос поглощения связано в основном с тем, что как основному, так и возбужденному состоянию соответствует набор различных колебательных состояний, в котором может существовать молекула. Использование полярных растворителей приводит к усилению взаимодействия растворитель – растворенное вещество и к размытию структуры. Величины полуширины полос поглощения имеют приемлемые значения, что обуславливает воспроизводимость и правильность определения.

Значения интегральной интенсивности полос поглощения изучаемого соединения составляют  $0,562 \cdot 10^8$  –  $0,633 \cdot 10^8$ ; момента электронного перехода –  $8,57 \cdot 10^{-9}$  –  $9,08 \cdot 10^{-9}$  и показывают полное количество энергии, затраченное на электронные переходы. Сила осциллятора полос спектров поглощения находится в пределах 0,243-0,273, что подтверждает существование  $\pi \rightarrow \pi^*$  электронных переходов при поглощении света исследуемым соединением.

Для спектра КОН-1 в кислой среде рассчитать оптические

характеристики невозможно, т.к. он не имеет четко выраженных полос поглощения.

Оптические параметры электронных спектров поглощения изучаемого соединения, имеющие индивидуальные значения, позволяют их использовать для дополнительной идентификации КОН-1 (для отличия от аналогичных производных 3-пирролин-2-она) [76].

Для подтверждения подлинности субстанции КОН-1 в ФСП включена следующая методика.

**Подлинность.** 0,05 г субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в спирте 96%, доводят объём раствора этим растворителем до метки и перемешивают. 2 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида, доводят объём раствора спиртом 96% до метки и перемешивают. Ультрафиолетовый спектр поглощения полученного 0,001% раствора субстанции в области от 220 до 350 нм должен иметь максимум при 328 нм.

*Приготовление раствора сравнения:* 10 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объём раствора спиртом 96% до метки и перемешивают.

### 3.3.3. ЯМР $^1\text{H}$ -спектроскопия

Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР исследуемого соединения записан с рабочей частотой 300 МГц в дейтерированном диметилсульфоксиде ( $\text{DMSO} - d_6$ ), в качестве внутреннего стандарта измерений химических сдвигов использовали тетраметилсилан  $\delta(\text{TMS}) = 0,00$  мд.

В спектре ЯМР  $^1\text{H}$  соединения (рис. 3.5) наблюдаются синглет метинового протона в положении 5 гетероцикла при 5,15 м.д., мультиплет ароматических протонов при 7,02-7,46 м.д., синглет протона енольной гидроксильной группы пирролинового цикла и триплет протона гидроксильной группы алифатической цепи при 11,4 и 4,3 м.д.

соответственно, синглет протонов метильной группы при 2,24 м.д., два мультиплета протонов метиленовой группы в положении 3 алифатической цепи при 2,61 и 3,45 м.д., дублет протонов метиленовой группы алкильного заместителя в положении 1 и мультиплет протонов метиленовой группы в положении 2 при 3,27 и 1,48 м.д. соответственно. Как видно, спектр  $^1\text{H}$  ЯМР подтверждает структуру исследуемого соединения и может быть использован для отличия КОН-1 от близких по химической структуре веществ [40, 76].

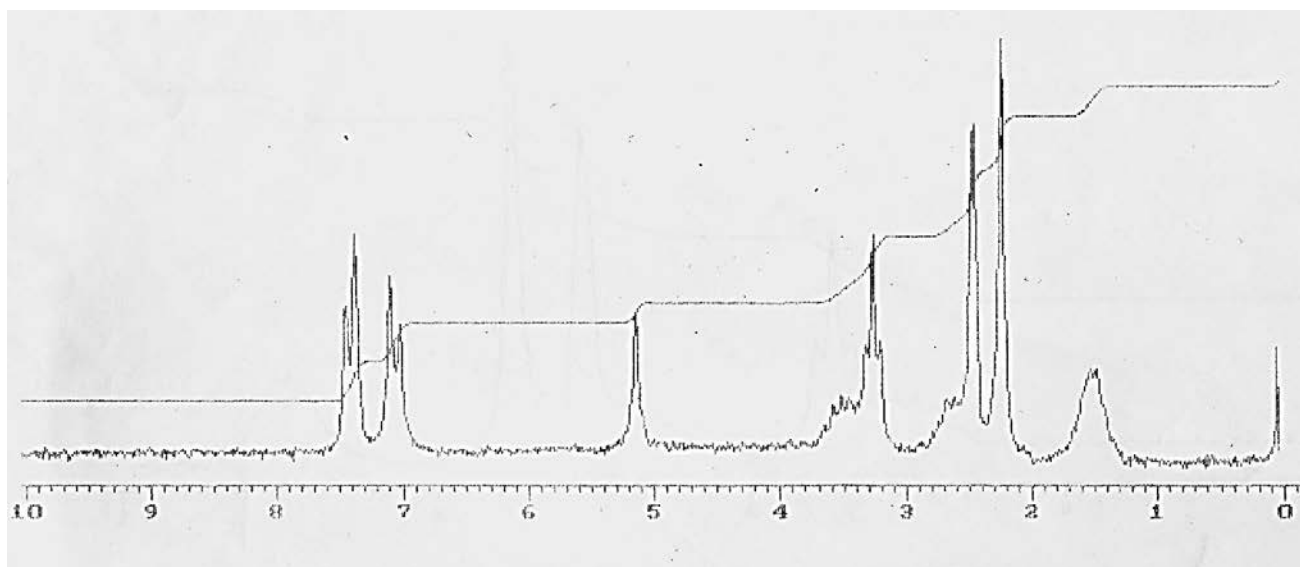


Рисунок 3.5 - Спектр ЯМР  $^1\text{H}$

### 3.4. Химические свойства. Реакции подлинности

Для идентификации КОН-1 использовали реакции подлинности, обусловленные свойствами енольного гидроксила в его структуре. Указанная функциональная группа придает соединению слабые кислотные свойства, обуславливает взаимодействие с гидроксидами щелочных металлов с образованием солей [2, 31, 83]. Наличие бензольного радикала в молекуле КОН-1 позволяет проведение реакций электрофильного замещения [53, 78, 83].

Чувствительность реакций устанавливали методом последовательных разбавлений исходного спиртового раствора субстанции.



*Методика.* 0,1 г субстанции КОН-1 помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 20 мл спирта 96%, доводили объём раствора спиртом 96% до метки и перемешивали (раствор А).

К 2 мл раствора А прибавляли 0,05 мл 3% раствора железа(III) хлорида или 0,1 мл 10% раствора меди(II) сульфата.

2 мл раствора А помещали в выпарительную чашку, выпаривали досуха на водяной бане. К сухому остатку прибавляли 0,15 мл серной кислоты концентрированной или 0,1 мл раствора формальдегида в серной кислоте.

Во всех опытах фиксировали результат реакции. При положительном эффекте проводили последующие разбавления раствора А.

Для подтверждения подлинности субстанции КОН-1 предложены следующие реакции [44, 85].

Железа(III) хлорид. 0,02 г субстанции растворяют в 2 мл спирта 96% и прибавляют 0,05 мл 3% раствора железа(III) хлорида; появляется красное окрашивание (предельное разбавление 1:40000; предел обнаружения 0,05 мг).

Меди(II) сульфат. 0,02 г субстанции растворяют в 2 мл спирта 96% и прибавляют 0,1 мл 10% раствора меди(II) сульфата; появляется зеленое окрашивание (предельное разбавление 1:4000; предел обнаружения 0,5 мг).

Серная кислота концентрированная. 0,05 г субстанции помещают в выпарительную чашку и прибавляют 0,15 мл реактива; появляется красное окрашивание (предел обнаружения 0,1 мг).

Формальдегида раствор в серной кислоте. 0,05 г субстанции помещают в выпарительную чашку и прибавляют 0,1 мл реактива; появляется желтое окрашивание (предел обнаружения 0,2 мг).

Для установления избирательности (селективности) предлагаемых реакций параллельно проводились исследования (табл. 3.8) с аналогичными производными 3-пирролин-2-она: ВКВ-1 и ВКВ-2 (отличаются от КОН-1 заместителем в 1 положении цикла – содержат карбоксиалкильную группу).

**Таблица 3.8 - Эффекты реакций КОН-1, ВКВ-1 и ВКВ-2**

| Реактив                                | Эффект реакции с производными 3-пирролин-2-она |                           |                          |
|--|--|---------------------------|--------------------------|
|  | КОН-1  | ВКВ-1                     | ВКВ-2                    |
| Раствор железа(III) хлорида 3%         | Красное окрашивание                            | Красное окрашивание       | Красное окрашивание      |
| Раствор меди(II) сульфата 10%          | Зеленое окрашивание                            | Темно-зеленое окрашивание | Зеленое окрашивание      |
| Серная кислота концентрированная       | Красное окрашивание                            | Темно-желтое окрашивание  | Желтое окрашивание       |
| Формальдегида раствор в серной кислоте | Желтое окрашивание                             | Темно-зеленое окрашивание | Темно-желтое окрашивание |

В проект ФСП на субстанцию КОН-1 целесообразно включение реакции с раствором железа(III) хлорида (общегрупповая реакция) и серной кислотой концентрированной (избирательная реакция).

### 3.5. Микробиологическая чистота

К субстанции КОН-1 могут быть предъявлены требования, как к нестерильным лекарственным средствам, которые могут быть контаминированы микроорганизмами и поэтому должны быть испытаны на микробиологическую чистоту [30, 69].

Перед проведением контроля определялось наличие или отсутствие антимикробного действия, во избежание неправильной оценки результатов анализа (таб. 3.9).

Исследования показали, что данное соединение в условиях опыта не обладает противомикробной активностью.

**Таблица 3.9 – Результаты определения антимикробной активности субстанции КОН-1**

| Разведение субстанции | Тест-микрорганизмы               |                                 |                                  |                                 |                                   |                                      |                                |
|-----------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
|                       | <i>B.cereus</i><br>АТСС<br>10702 | <i>E. coli</i><br>АТСС<br>25922 | <i>S.abony</i><br>ГИСК<br>103/39 | <i>P.aeruginosa</i><br>ГИСК 453 | <i>S.aureus</i><br>АТСС<br>6538-Р | <i>C.albicans</i><br>АТСС<br>885-653 | <i>A.niger</i><br>ВКМФ<br>1119 |
| 1:10                  | +                                | +                               | +                                | +                               | +                                 | +                                    | +                              |
| 1:20                  | +                                | -                               | -                                | +                               | +                                 | +                                    | +                              |
| 1:50                  | +                                | +                               | +                                | +                               | +                                 | +                                    | +                              |
| 1:100                 | +                                | +                               | +                                | +                               | +                                 | +                                    | +                              |
| Контроль культуры     | +                                | +                               | +                                | +                               | +                                 | +                                    | +                              |

Обозначение: + - наличие роста тест-микроорганизмов, -- отсутствие роста тест-микроорганизмов.

Испытание на микробиологическую чистоту включает в себя количественное определение жизнеспособных бактерий и грибов, а также выявление бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (семейство кишечной палочки), *S.aureus* (золотистый стафилококк) и *P. Aeruginosa* (синегнойная палочка), наличие которых недопустимо в нестерильных лекарственных средствах. Для субстанций синтетического происхождения, предназначенных для производства нестерильных лекарственных препаратов (категория 2.2), ОФС «Микробиологическая чистота» [69] установлены нормативные требования: общее число аэробных бактерий не более  $10^3$  в 1 г; общее число грибов не более  $10^2$  в 1 г; отсутствие *Escherichia coli* в 1 г.

По методике ОФС проведено определение микробиологической чистоты субстанции КОН-1 в течение предлагаемого срока хранения. Экспериментально установлено отсутствие бактерий *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*. Содержание аэробных микроорганизмов, плесневых и дрожжевых грибов соответствует требованиям Государственной фармакопеи XII (табл. 3.10).

**Таблица 3.10 - Результаты определения микробиологической чистоты субстанции КОН-1**

| № | Образцы | Кол-во аэробных бактерий | Кол-во грибов | E. coli | S. aureus | P.aeruginosa |
|---|---------|--------------------------|---------------|---------|-----------|--------------|
| 1 | 241109  | 60                       | 40            | Отсут.  | Отсут.    | Отсут.       |
| 2 | 100210  | 60                       | 70            | Отсут.  | Отсут.    | Отсут.       |
| 3 | 261010  | 50                       | 30            | Отсут.  | Отсут.    | Отсут.       |

Результаты исследований показали, что субстанция КОН-1 удовлетворяет требованиям ОФС по показателю «Микробиологическая чистота» [76].

### ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3

1. Изучены физические свойства лабораторных образцов нового БАС КОН-1. Для нормирования качества субстанции рекомендованы показатели, достоверно определяющие её доброкачественность: описание, растворимость, температура плавления, кислотность или щелочность водного извлечения, потеря в массе при высушивании, хлориды и сульфаты, сульфатная зола и тяжелые металлы.

2. Исследован ИК-спектр субстанции КОН-1, проведено отнесение полос поглощения (лактамной карбонильной, кетонной карбонильной и гидроксильной групп, углерод-углеродной связи). Рекомендовано приоритетное установление подлинности субстанции соединения по ИК-спектру.

3. Установлено, что УФ-спектры КОН-1 в нейтральном растворителе (спирт 96%) и 0,01 М растворе натрия гидроксида (рН 12) имеют один четко выраженный максимум поглощения при  $328 \pm 2$  нм, минимум – при  $283 \pm 2$  нм. В 0,01М растворе кислоты хлористоводородной наблюдается гипсохромный сдвиг поглощения КОН-1 в область 230 - 260 нм - «плечо»; при этом отсутствуют выраженные экстремумы поглощения. Поглощение КОН-1 в УФ области обусловлено электронными переходами внутри пирролинового цикла; изменение положения максимума поглощения в нейтральной и щелочной средах обусловлено ионизацией енольной гидроксильной группы. Рассчитанные оптические параметры электронных спектров (удельный и молярный показатели поглощения; полуширина полосы поглощения; фактор асимметрии; интегральная интенсивность полосы поглощения; сила осциллятора; момент электронного перехода), имеющие индивидуальные значения, позволяют их использовать для дополнительной идентификации КОН-1 (для отличия от аналогичных производных 3-пирролин-2-она).

4. Исследован  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр субстанции КОН-1, подтверждающий структуру соединения. Показана возможность использования его для отличия КОН-1 от близких по химической структуре веществ.

5. Для идентификации КОН-1 использованы реакции подлинности, обусловленные свойствами енольного гидроксила и бензольного радикала в его структуре. В проект ФСП на субстанцию КОН-1 целесообразно включение достаточно чувствительных реакций с раствором железа(III) хлорида (общегрупповая реакция) и серной кислотой концентрированной (избирательная реакция).

6. Исследована микробиологическая чистота субстанции КОН-1. Установлено, что соединение в условиях опыта не обладает противомикробной активностью. Показано отсутствие бактерий *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*. Содержание аэробных бактерий, плесневых и дрожжевых грибов соответствует требованиям Государственной фармакопеи XII (категория 2.2).

## ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБСТАНЦИИ КОН-1

### 4.1. Титриметрический метод

Титриметрические методы нашли широкое применение в анализе лекарственных средств. По совокупности положительных свойств - высокой точности, скорости и простоте выполнения - титрование с визуальной фиксацией точки конца титрования в ближайшее время сохранит свое значение, как при оценке качества субстанций, так и лекарственных форм промышленного производства. В отличие от инструментальных титриметрические методы не требуют наличия стандартного образца исследуемого вещества, дорогостоящего оборудования [31, 33, 53, 83, 93].

Поскольку в молекуле КОН-1 содержится одна енольная гидроксильная функциональная группа, нами проведены исследования по разработке методики алкалиметрического определения соединения.

#### 4.1.1. Определение константы ионизации КОН-1

В качестве растворителей использовали смеси диметилформаида или спирта этилового с водой. Растворы КОН-1 готовили таким образом, чтобы в точке полунейтрализации концентрация их составляла 0,01 моль/л.

*Методика.* 0,1771 г (точная навеска) субстанции КОН-1 растворяли в 10,0 мл диметилформаида или спирта 96%, прибавляли 37,50 мл воды (до общего объёма раствора 47,50 мл) и перемешивали. К полученному раствору десятью порциями, каждая из которых равна одной десятой эквивалента, добавляли титрант - 0,1 М раствор натрия гидроксида, перемешивали с помощью магнитной мешалки. Затем после каждого добавления, как только установится равновесие, измеряли значение рН раствора.

Результаты определения константы ионизации КОН-1 приведены в табл. 4.1 и 4.2.

**Таблица 4.1 - Результаты определения константы ионизации КОН-1  
(растворитель – смесь спирт этиловый - вода)**

| Объем титранта, мл               | Значение рН раствора (n=3) | Стехиометрические концентрации |                   | [НА] / [А <sup>-</sup> ] | lg чисел из столбца 5 | рК <sub>а</sub> (сумма чисел из столбцов 2 и 6) |
|----------------------------------|----------------------------|--------------------------------|-------------------|--------------------------|-----------------------|---|
|                                  |                            | [НА]                           | [А <sup>-</sup> ] |                          |                       |   |
| 1                                | 2                          | 3                              | 4                 | 5                        | 6                     | 7   |
| 0                                | 1,23                       | 0,010                          | 0                 | -                        | -                     | -   |
| 0,5                              | 2,23                       | 0,009                          | 0,001             | 9/1                      | 0,95                  | 3,18  |
| 1,0                              | 2,63                       | 0,008                          | 0,002             | 8/2                      | 0,60                  | 3,23  |
| 1,5                              | 2,85                       | 0,007                          | 0,003             | 7/3                      | 0,37                  | 3,22  |
| 2,0                              | 3,05                       | 0,006                          | 0,004             | 6/4                      | 0,18                  | 3,23  |
| 2,5                              | 3,20                       | 0,005                          | 0,005             | 5/5                      | 0,00                  | 3,20  |
| 3,0                              | 3,37                       | 0,004                          | 0,006             | 4/6                      | -0,18                 | 3,19  |
| 3,5                              | 3,60                       | 0,003                          | 0,007             | 3/7                      | -0,37                 | 3,23  |
| 4,0                              | 3,82                       | 0,002                          | 0,008             | 2/8                      | -0,60                 | 3,22  |
| 4,5                              | 4,15                       | 0,001                          | 0,009             | 1/9                      | -0,95                 | 3,20  |
| 5,0                              | 4,35                       | 0                              | 0,010             | -                        | -                     | -   |
| Среднее значение рК <sub>а</sub> |                            |                                |                   |                          |                       | 3,21±0,03                                       |

Примечание. рН воды – 5,55; рН спирта 96% – 6,50.

**Таблица 4.2 - Результаты определения константы ионизации КОН-1  
(растворитель – смесь диметилформамид - вода)**

| Объем титранта, мл               | Значение рН раствора (n=3) | Стехиометрические концентрации |                   | [НА] / [А <sup>-</sup> ] | lg чисел из столбца 5 | рК <sub>а</sub> (сумма чисел из столбцов 2 и 6) |
|----------------------------------|----------------------------|--------------------------------|-------------------|--------------------------|-----------------------|---|
|                                  |                            | [НА]                           | [А <sup>-</sup> ] |                          |                       |   |
| 1                                | 2                          | 3                              | 4                 | 5                        | 6                     | 7   |
| 0                                | 2,45                       | 0,010                          | 0                 | -                        | -                     | -   |
| 0,5                              | 3,85                       | 0,009                          | 0,001             | 9/1                      | 0,95                  | 4,80  |
| 1,0                              | 4,22                       | 0,008                          | 0,002             | 8/2                      | 0,60                  | 4,82  |
| 1,5                              | 4,49                       | 0,007                          | 0,003             | 7/3                      | 0,35                  | 4,84  |
| 2,0                              | 4,67                       | 0,006                          | 0,004             | 6/4                      | 0,18                  | 4,85  |
| 2,5                              | 4,85                       | 0,005                          | 0,005             | 5/5                      | 0,00                  | 4,85  |
| 3,0                              | 5,01                       | 0,004                          | 0,006             | 4/6                      | -0,18                 | 4,83  |
| 3,5                              | 5,19                       | 0,003                          | 0,007             | 3/7                      | -0,37                 | 4,82  |
| 4,0                              | 5,40                       | 0,002                          | 0,008             | 2/8                      | -0,60                 | 4,80  |
| 4,5                              | 5,73                       | 0,001                          | 0,009             | 1/9                      | -0,95                 | 4,78  |
| 5,0                              | 5,98                       | 0                              | 0,010             | -                        | -                     | -   |
| Среднее значение рК <sub>а</sub> |                            |                                |                   |                          |                       | 4,85±0,07                                       |

Примечание. рН воды – 5,52; рН ДМФА – 7,43.



Рассчитанные по результатам титрования значения  $pK_a$  в водно-спиртовом и водно-диметилформаидном растворах составили  $3,21 \pm 0,03$  и  $4,85 \pm 0,07$  соответственно, что позволяет сделать вывод о достаточно сильных кислотных свойствах КОН-1. Диметилформаид уменьшает диссоциацию енольной гидроксильной группы в изучаемом соединении.

Спиртовый и диметилформаидный растворы КОН-1 могут быть оттитрованы водным раствором натрия гидроксида на 99,99% при рН 7,21 и 8,85 соответственно [2].

#### **4.1.2. Титрование с потенциометрическим определением точки эквивалентности.**

*Методика.* Около 0,2 г (точная навеска) субстанции КОН-1 растворяли в 10,0 мл диметилформаида или спирта 96%, прибавляли 10 мл воды и перемешивали. Полученный раствор титровали из микробюретки 0,1 М раствором натрия гидроксида до появления скачков рН. Обработка экспериментальных данных заключалась в построении графика зависимости рН от объема добавляемого титранта. Эквивалентный объем титранта вычисляли из экспериментальных данных по формуле, приведенной в ГФ Х1, вып.1, с.121 [28].

На кривых титрования КОН-1 наблюдался один скачок в области рН 6,5-9,4, что полностью согласуется с константами ионизации исследуемого соединения. При визуальном определении точки эквивалентности следует использовать индикаторы с соответствующим интервалом перехода рН.

По результатам потенциометрического титрования рассчитано содержание действующего вещества (X, %) по общепринятой формуле (табл. 4.3). 1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида соответствует 0,03542 г КОН-1.

**Таблица 4.3 - Результаты потенциометрического титрования КОН-1**

| Взято<br>субстанции<br>КОН-1, г      | Растворитель | $V_{\text{NaOH}}$<br>(0,1 М),<br>мл | Определено<br>КОН-1, %             | Метрологические<br>данные   |
|--------------------------------------|--------------|-------------------------------------|------------------------------------|---|
| 0,1993<br>0,1867<br>0,2007<br>0,2032 | ДМФА         | 5,63<br>5,27<br>5,65<br>5,76        | 100,10<br>99,90<br>99,81<br>100,32 | $X_{\text{средн}} = 100,03$<br>$S_X = 0,23$<br>$\Delta X_{\text{средн}} = 0,73$<br>$\varepsilon_{\text{средн}} = \pm 0,73 \%$ |
| 0,1997<br>0,2004<br>0,1999<br>0,1996 | Спирт 96%    | 5,64<br>5,61<br>5,61<br>5,61        | 100,12<br>99,14<br>99,31<br>99,52  | $X_{\text{средн}} = 99,54$<br>$S_X = 0,10$<br>$\Delta X_{\text{средн}} = 0,32$<br>$\varepsilon_{\text{средн}} = \pm 0,32\%$   |

**4.1.3. Титрование с визуальным определением точки эквивалентности.**

Изучена возможность алкалиметрического определения КОН-1 с визуальной фиксацией точки эквивалентности. В качестве индикаторов использовали кислотно-основные с рТ, соответствующим рН точки эквивалентности соединения, установленным при потенциометрическом титровании. Результаты помещены в табл. 4.4.

Положительные результаты достигнуты при использовании в качестве индикаторов тимолового синего и фенолфталеина, что соответствует константам ионизации соединения и данным потенциометрического титрования. В дальнейших исследованиях применялся фенолфталеин, имеющий более четкий переход окраски индикатора. В качестве растворителя субстанции выбран спирт 96%, повышающий кислотные свойства КОН-1 [1, 10, 18].

**Таблица 4.4 - Алкалиметрическое определение КОН-1 с использованием различных индикаторов**

| Индикатор                 | Интервал перехода цвета (рН) | Определено КОН-1, % (n=3) |                          | Примечание                          |
|---------------------------|------------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
|                           |                              | В среде спирта 96%        | В среде диметилформамида |                                     |
| Бромкрезоловый пурпуровый | 5,2-6,8                      | 99,23±0,43                | 98,15±0,50               |                                     |
| Бромтимоловый синий       | 6,0-7,6                      | 99,75±0,25                | 99,15±0,34               |                                     |
| Нейтральный красный       | 6,8-8,0                      | 99,65±0,66                | 99,57±0,45               | Нечеткий переход окраски индикатора |
| Феноловый красный         | 6,8-8,4                      | 99,73±0,58                | 99,65±0,45               | Нечеткий переход окраски индикатора |
| Тимоловый синий           | 8,0-9,6                      | 99,75±0,35                | 99,84±0,65               |                                     |
| Фенолфталеин              | 8,2-10,0                     | 99,79±0,37                | 99,85±0,58               |                                     |
| Тимолфталеин              | 9,4-10,6                     | 101,87±0,58               | 101,23±0,42              |                                     |

*Методика.* Около 0,2 г (точная навеска) субстанции, предварительно высушенной до постоянной массы при температуре 100-105 °С, растворяют в 20 мл спирта 96% и титруют 0,1 М раствором натрия гидроксида до появления розовой окраски раствора (индикатор – фенолфталеин). Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида соответствует 35,42 мг  $C_{15}H_{16}NO_4Br$ .

#### **4.1.4. Валидация методики**

Для оценки пригодности предлагаемой методики [43] проведена её валидация по показателям: линейность результатов, правильность и сходимость в аналитической области методики [75].

### *Линейность и правильность результатов*

Осуществляли статистическую обработку выборок, полученных в результате количественного анализа навесок субстанции КОН-1 на трех уровнях концентрации (в диапазоне 80-120% от количества исследуемого вещества, принятого за 100% - 0,2 г). Полученные результаты представлены в табл. 4.5.

Данные, приведенные в таблице 4.5, показывают, что на каждом уровне концентрации КОН-1 и в целом в пределах рекомендуемой аналитической области методики получены сходимые результаты. Поэтому по полученным данным построен график зависимости объема титранта от навески субстанции КОН-1 (рис. 4.1). Линия тренда пересекает ось «Объем титранта» в точке 0,001 мл, что свидетельствует о правильности разработанной методики.

**Таблица 4.5 - Метрологическая характеристика алкалиметрической методики определения субстанции КОН-1**

| Уровень                   | Навеска, г | Объем титранта, мл | Содержание КОН-1, % | Метрологические данные |           |      |      |            |            |
|---------------------------|------------|--------------------|---------------------|------------------------|-----------|------|------|------------|------------|
|                           |            |                    |                     | n                      | $\bar{X}$ | S    | Sx   | $\Delta X$ | $\epsilon$ |
| 80%                       | 0,16117    | 4,56               | 100,21              | 3                      | 100,05    | 0,16 | 0,11 | 0,66       | 0,65       |
|                           | 0,16075    | 4,54               | 100,03              |                        |           |      |      |            |            |
|                           | 0,16235    | 4,58               | 99,92               |                        |           |      |      |            |            |
| 100%                      | 0,20525    | 5,80               | 100,09              | 3                      | 99,96     | 0,13 | 0,09 | 0,41       | 0,40       |
|                           | 0,20381    | 5,75               | 99,93               |                        |           |      |      |            |            |
|                           | 0,19790    | 5,58               | 99,87               |                        |           |      |      |            |            |
| 120%                      | 0,24236    | 6,85               | 100,11              | 3                      | 100,08    | 0,22 | 0,15 | 1,29       | 1,26       |
|                           | 0,24027    | 6,80               | 100,24              |                        |           |      |      |            |            |
|                           | 0,23935    | 6,75               | 99,89               |                        |           |      |      |            |            |
| Вся аналитическая область |            |                    |                     | 9                      | 100,03    | 0,17 | 0,12 | 0,79       | 0,78       |
| Уравнение линии тренда    |            |                    |                     | $Y = 28,263X + 0,001$  |           |      |      |            |            |

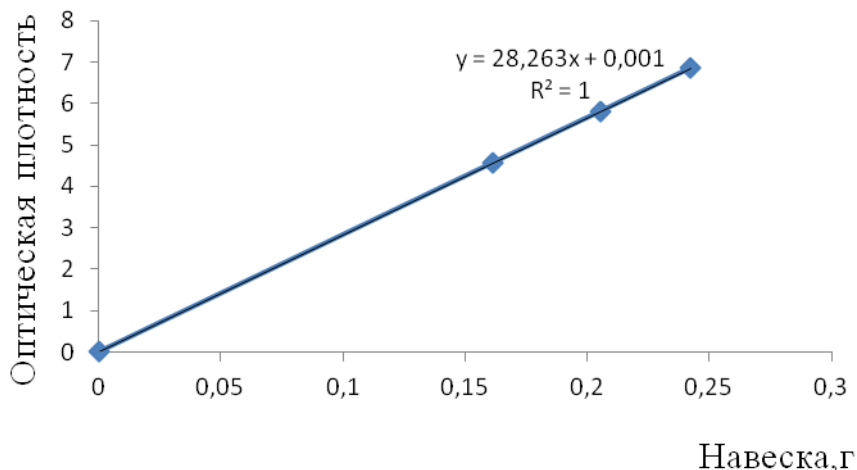


Рисунок 4.1 - График зависимости объема титранта от навески субстанции КОН-1

*Повторяемость (сходимость) результатов.*

Повторяемость (сходимость) устанавливали по результатам 6 параллельных определений, полученных по предлагаемой методике (таблица 4.6). Оценка повторяемости (сходимости) показала, что относительная ошибка результата среднего результата не превышает  $\pm 0,198\%$ .

**Таблица 4.6 – Повторяемость (сходимость) результатов алкалиметрической методики определения субстанции КОН-1**

| Навеска субстанции<br>КОН-1, г | Объём титранта, мл | Определено КОН-1,<br>г | Метрологические<br>данные   |
|--------------------------------|--------------------|------------------------|---|
| 0,20525                        | 5,80               | 100,09                 | $X_{\text{средн}} = 99,87$<br>$S = 0,172$<br>$S_x \text{ средн} = 0,0771$<br>$\Delta X = 0,44$<br>$\Delta X_{\text{средн}} = 0,20$<br>$\varepsilon = \pm 0,44\%$<br>$\varepsilon_{\text{средн}} = \pm 0,20\%$ |
| 0,20381                        | 5,75               | 99,93                  |   |
| 0,19790                        | 5,58               | 99,87                  |   |
| 0,19885                        | 5,60               | 99,75                  |   |
| 0,20234                        | 5,70               | 99,78                  |   |
| 0,20401                        | 5,75               | 99,83                  |   |

**4.1.5. Апробация методики**

Разработанная методика использована для количественного определения пяти серий субстанции КОН-1. Результаты, представленные в

табл. 4.7 свидетельствуют, что содержание исследуемого вещества в субстанции составляет не менее 99%. Методика включена в проект ФСП на субстанцию КОН-1.

**Таблица 4.7 – Результаты количественного определения различных серий субстанции КОН-1 (n=5)**

| Серия  | $X_{\text{средн}}$ | $S_{X_{\text{средн}}}$ | $\Delta X_{\text{средн}}$ | $\epsilon_{\text{средн}}$ |
|--------|--------------------|------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 241109 | 99,87 (n=6)        | 0,077                  | 0,20                      | $\pm 0,20$                |
| 100210 | 99,74              | 0,093                  | 0,26                      | $\pm 0,26$                |
| 261010 | 99,85              | 0,105                  | 0,29                      | $\pm 0,29$                |
| 300311 | 99,65              | 0,127                  | 0,35                      | $\pm 0,35$                |
| 270212 | 99,58              | 0,095                  | 0,26                      | $\pm 0,26$                |

#### 4.2. Спектрофотометрия в УФ области

Наличие четко выраженного характерного максимума поглощения в растворе натрия гидроксида и высокое значение удельного показателя поглощения (раздел 3.3.2) позволяют использовать собственное поглощение КОН-1 для количественного определения соединения; аналитическая длина волны – 328 нм.

Методика. Около 0,05 г (точная навеска) субстанции, предварительно высушенной до постоянной массы при температуре 100-105 °С, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в спирте 96%, доводят объём раствора этим же растворителем до метки и перемешивают (раствор А).

2 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида, доводят объём раствора спиртом 96% до метки и перемешивают. У полученного раствора

измеряют оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 328 нм в кювете с толщиной слоя 1 см.

В качестве раствора сравнения используют контрольный опыт: 10 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объём раствора спиртом 96% до метки и перемешивают.

### Валидация методики

Для оценки пригодности предлагаемой методики проведена её валидация по показателям: линейность результатов, правильность и сходимость в аналитической области методики, предел обнаружения, избирательность [75].

#### *Линейность (проверка соблюдения основного закона светопоглощения)*

В разных опытах от 0,4 до 4,0 мл раствора А помещали в мерные колбы вместимостью 100 мл, прибавляли по 10 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида и далее поступали, как указано в основной методике.

Результаты исследования приведены в таблице 4.8. и на рисунке 4.2.

**Таблица 4.8 - Показатели калибровочного графика раствора КОН-1**

| Концентрация<br>КОН-1 |        | Оптическая<br>плотность<br>раствора | Удельный<br>показатель<br>поглощения |
|-----------------------|--------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| мкг/мл                | %      |                                     |                                      |
| 2                     | 0,0002 | 0,0835                              | 417,5                                |
| 4                     | 0,0004 | 0,171                               | 427,5                                |
| 6                     | 0,0006 | 0,253                               | 421,7                                |
| 8                     | 0,0008 | 0,329                               | 411,2                                |
| 10                    | 0,0010 | 0,405                               | 405,0                                |
| 12                    | 0,0012 | 0,498                               | 415,0                                |
| 14                    | 0,0014 | 0,568                               | 405,7                                |
| 16                    | 0,0016 | 0,652                               | 407,5                                |
| 18                    | 0,0018 | 0,732                               | 406,7                                |
| 20                    | 0,0020 | 0,819                               | 409,5                                |

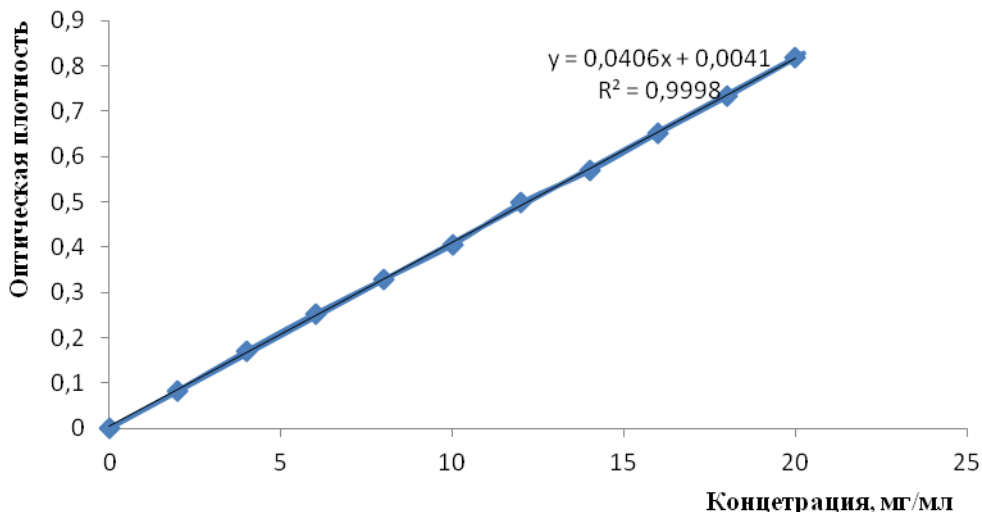


Рисунок 4.2 - Зависимость оптической плотности от концентрации КОН-1

Установлено, что график зависимости оптической плотности от концентрации имеет линейный характер в пределах концентраций КОН-1 2 – 20 мкг/мл и описывается уравнением регрессии:  $Y = 0,0406 X + 0,0041$ .

#### *Повторяемость (сходимость) результатов*

Устанавливали по результатам 8 параллельных определений (таблица 4.9). Оценка повторяемости (сходимости) показала, что относительная ошибка результата отдельного определения не превышает  $\pm 2,15\%$ .

#### *Предел обнаружения КОН-1*

Определяли расчетным методом [10, 13, 91], используя цифровые данные удельных и молярных показателей поглощения, приняв  $D_{\min} 0,025$ .

Результаты приведены в табл. 4.10. Методика достаточно чувствительна для анализа КОН-1 в лекарственных препаратах.



**Таблица 4.9 - Оценка повторяемости (сходимости) результатов**

| №                   | Навеска<br>субстанции,<br>КОН-1, г | Оптическая<br>плотность<br>раствора | Удельный<br>показатель<br>поглощения | Молярный<br>показатель<br>поглощения | Метрологические<br>данные (для<br>оптической<br>плотности)  |
|---------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---|
| 1                   | 0,0500                             | 0,4051                              | 405,1                                | 14350                                | $X_{\text{средн}} = 0,4047$<br>$S = 0,0037$<br>$S_{x \text{ средн}} = 0,0013$<br>$\Delta X = 0,0087$<br>$\Delta X_{\text{средн}} = 0,0031$<br>$\varepsilon = 2,15\%$<br>$\varepsilon_{\text{средн}} = 0,76\%$ |
| 2                   | 0,0500                             | 0,4031                              | 403,1                                | 14280                                |   |
| 3                   | 0,0500                             | 0,4057                              | 405,7                                | 14370                                |   |
| 4                   | 0,0500                             | 0,4111                              | 411,1                                | 14560                                |   |
| 5                   | 0,0500                             | 0,4053                              | 405,3                                | 14360                                |   |
| 6                   | 0,0500                             | 0,4047                              | 404,7                                | 14330                                |   |
| 7                   | 0,0500                             | 0,4054                              | 405,4                                | 14360                                |   |
| 8                   | 0,0500                             | 0,3976                              | 397,6                                | 14080                                |   |
| Среднее<br>значение |                                    | 0,4047                              | 404,7                                | 14340                                |   |

**Таблица 4.10 - Предел обнаружения КОН-1 спектрофотометрическим методом (в УФ-области спектра)**

| Показатели поглощения    |               | Пределы обнаружения |          |
|--------------------------|---------------|---------------------|----------|
| $E_{1 \text{ см}}^{1\%}$ | $\varepsilon$ | мкг/мл              | мкмоль/л |
| 404,7                    | 14340         | 0,617               | 1,74     |

*Правильность результатов*

Оценка осуществлялась путем статистической обработки выборок, полученных в ходе количественного анализа субстанции КОН-1 в модельных пробах на трех уровнях концентрации в пределах рекомендуемой аналитической области методики (80, 100, 120% от количества принятого за 100% - 0,05г): брали разные навески субстанции КОН-1 (0,0400 г– 80%, 0,0500 г – 100%, 0,0600 г– 120%).

Результаты анализов представлены в таблицах 4.11 – 4.12.

**Таблица 4.11- Оценка правильности разработанной методики на  
трех уровнях концентраций КОН-1**

| № опыта     | Навеска<br>субстанц<br>ии<br>КОН-1, г | Концентрация<br>КОН-1 в<br>спектрофотоме<br>трируемом<br>растворе,<br>мкг/мл | Оптическая<br>плотность | Метрологические данные<br>(для оптической плотности)   |
|-------------|---------------------------------------|--|-------------------------|--|
| 1<br>(80%)  | 0,0400                                | 8  | 0,321<br>0,324<br>0,322 | $X_{\text{средн}} = 0,322$<br>$S = 0,00123$<br>$Sx_{\text{средн}} = 0,00072$<br>$\Delta X = 0,0053$<br>$\Delta X_{\text{средн}} = 0,0031$<br>$\varepsilon = \pm 1,64\%$<br>$\varepsilon_{\text{средн}} = \pm 0,96\%$ |
| 2<br>(100%) | 0,0500                                | 10   | 0,406<br>0,404<br>0,403 | $X_{\text{средн}} = 0,404$<br>$S = 0,00158$<br>$Sx_{\text{средн}} = 0,00093$<br>$\Delta X = 0,0068$<br>$\Delta X_{\text{средн}} = 0,0039$<br>$\varepsilon = \pm 1,68\%$<br>$\varepsilon_{\text{средн}} = \pm 0,98\%$ |
| 3<br>(120%) | 0,0600                                | 12   | 0,473<br>0,469<br>0,477 | $X_{\text{средн}} = 0,473$<br>$S = 0,002$<br>$Sx_{\text{средн}} = 0,0011$<br>$\Delta X = 0,0086$<br>$\Delta X_{\text{средн}} = 0,0047$<br>$\varepsilon = \pm 1,81\%$<br>$\varepsilon_{\text{средн}} = \pm 0,99\%$    |

**Таблица 4.12 - Оценка правильности разработанной методики в  
пределах рекомендуемой аналитической области**

| № | Навеска<br>субстанции<br>КОН-1, г | Оптическая<br>плотность | Оптическая плотность<br>(в перерасчете на<br>100% навеску КОН-1) | Метрологическая<br>характеристика  |
|---|-----------------------------------|-------------------------|--|--|
| 1 | 0,0400                            | 0,321                   | 0,401  | $X_{\text{средн}} = 0,400$<br>$S = 0,00526$<br>$Sx_{\text{средн}} = 0,00175$<br>$\Delta X = 0,0124$<br>$\Delta X_{\text{средн}} = 0,0041$<br>$\varepsilon = \pm 3,10\%$<br>$\varepsilon_{\text{средн}} = \pm 1,02\%$ |
| 2 | 0,0400                            | 0,324                   | 0,405  |  |
| 3 | 0,0400                            | 0,322                   | 0,403  |  |
| 4 | 0,0500                            | 0,406                   | 0,406  |  |
| 5 | 0,0500                            | 0,404                   | 0,404  |  |
| 6 | 0,0500                            | 0,403                   | 0,403  |  |
| 7 | 0,0600                            | 0,473                   | 0,394  |  |
| 8 | 0,0600                            | 0,469                   | 0,391  |  |
| 9 | 0,0600                            | 0,477                   | 0,397  |  |

Данные, приведенные в таблицах 4.11 и 4.12, показывают, что на каждом уровне концентрации КОН-1 и в целом в пределах рекомендуемой аналитической области методики получены сходимые результаты. Поэтому по полученным данным построен график зависимости оптической плотности от концентрации раствора КОН-1 (рис. 4.3). Линия тренда пересекает ось «Оптическая плотность» в точке 0, что свидетельствует о правильности разработанной методики.

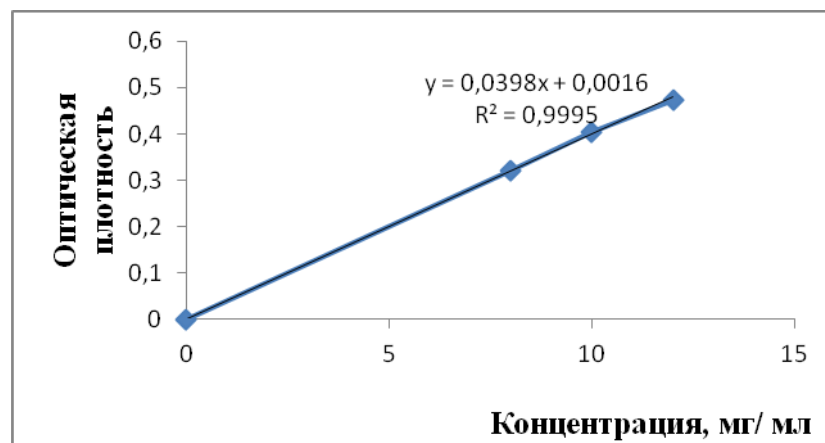


Рисунок 4.3 - Зависимость оптической плотности от концентрации КОН-1

### *Избирательность*

*(апробация методики для определения КОН-1 в грануляте состава: КОН-1; лактоза; ПВП)*

Готовили модельную смесь, содержащую равные количества компонентов гранулята (навески брали на весах аналитических).

Методика. 0,1500 г (точную навеску) модельной смеси помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл спирта 96%, перемешивали в течение 5 мин. Объем раствора в мерной колбе доводили до метки спиртом 96%, перемешивали и фильтровали через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А).

2 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 10 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида и далее поступали, как указано в основной методике.

Параллельно измеряли оптическую плотность раствора РСО (субстанции КОН-1, использованной для изготовления модельной смеси) (приготовление раствора, как в основной методике).

Количество КОН-1 в грануляте (X, г) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 100 \cdot a_0 \cdot 2 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 2 \cdot 100 \cdot 100} = \frac{A \cdot a_0 \cdot P}{A_0 \cdot a}, \text{ где}$$

A – оптическая плотность раствора модельной смеси;

A<sub>0</sub> – оптическая плотность раствора РСО;

a<sub>0</sub> – навеска РСО, г (0,0500 г);

a – навеска модельной смеси, г (0,1500 г);

P – условная общая масса модельной смеси, г (0,1500 г).

Результаты представлены в таблице 4.13.

Разработанная методика дает точные (правильные и сходимые) результаты; обладает высокой чувствительностью и избирательностью; проста в исполнении, не требуют дорогостоящих, токсичных реагентов. Методика рекомендована для количественного определения КОН-1 в составе гранулята [43].

**Таблица 4.13 - Метрологическая характеристика разработанной методики для определения КОН-1 в грануляте**

| Оптическая плотность раствора модельной смеси | Оптическая плотность раствора РСО | Определено КОН-1 в модельной смеси, г | Метрологическая характеристика  |
|---|-----------------------------------|---------------------------------------|---|
| 0,401   | 0,403                             | 0,0498                                | $X_{\text{средн}} = 0,0498$<br>$S = 0,00122$<br>$Sx_{\text{средн}} = 0,00054$<br>$\Delta X = 0,0033$<br>$\Delta X_{\text{средн}} = 0,0015$<br>$\varepsilon = \pm 6,62\%$<br>$\varepsilon_{\text{средн}} = \pm 3,01\%$ |
| 0,402   |                                   | 0,0499                                |   |
| 0,400   |                                   | 0,0498                                |   |
| 0,398   |                                   | 0,0497                                |   |
| 0,402   |                                   | 0,0499                                |   |

### 4.3. Спектрофотометрия в видимой области на основе реакции КОН-1 с раствором железа(III) хлорида

Исследования показали (раздел 3.4), что соединение КОН-1, содержащее енольный гидроксил у  $C_3$ , при взаимодействии с солями железа(III) образует интенсивно окрашенное соединение красного цвета. Реакция достаточно чувствительна: 1:40000 (в предельном разбавлении). Изучаемое БАС практически не растворимо в воде, поэтому в качестве растворителя использовали диметилформаид [38].

#### 4.3.1. Спектры поглощения продукта реакции КОН-1 с железа(III) хлоридом

Методика. 0,05 г субстанции КОН-1 помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 20 мл диметилформаида, доводили объём раствора до метки диметилформаидом и перемешивали (раствор А).

3 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 1 мл 1% раствора железа(III) хлорида, доводили объём раствора водой до метки и перемешивали (*раствор 1*).

1 мл 1% раствора железа(III) хлорида помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 3 мл диметилформаида, доводили объём раствора водой до метки и перемешивали (*раствор 2*).

3 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили объём раствора водой до метки и перемешивали (*раствор 3*).

Снимали дифференциальные спектры поглощения продукта реакции КОН-1 с 1% раствором железа(III) хлорида (*раствор 1*) в интервале длин волн от 350 до 700 нм на фотометре КФК-3-03 в кювете с толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения использовали растворитель, содержащий то же количество, что и анализируемые растворы: железа(III) хлорида (*раствор 2*) (график 1) или КОН-1 (*раствор 3*) (график 3). Концентрация КОН-1 в фотометрируемом растворе составила 0,012%.

Дополнительно для сравнения сняты спектры поглощения раствора железа(III) хлорида (*раствор 2*) (график 4) и КОН-1 (*раствор 3*) (график 2). В качестве раствора сравнения использовали раствор 3 мл диметилформамида в воде (мерная колба на 25 мл). Результаты представлены на рисунке 4.4.

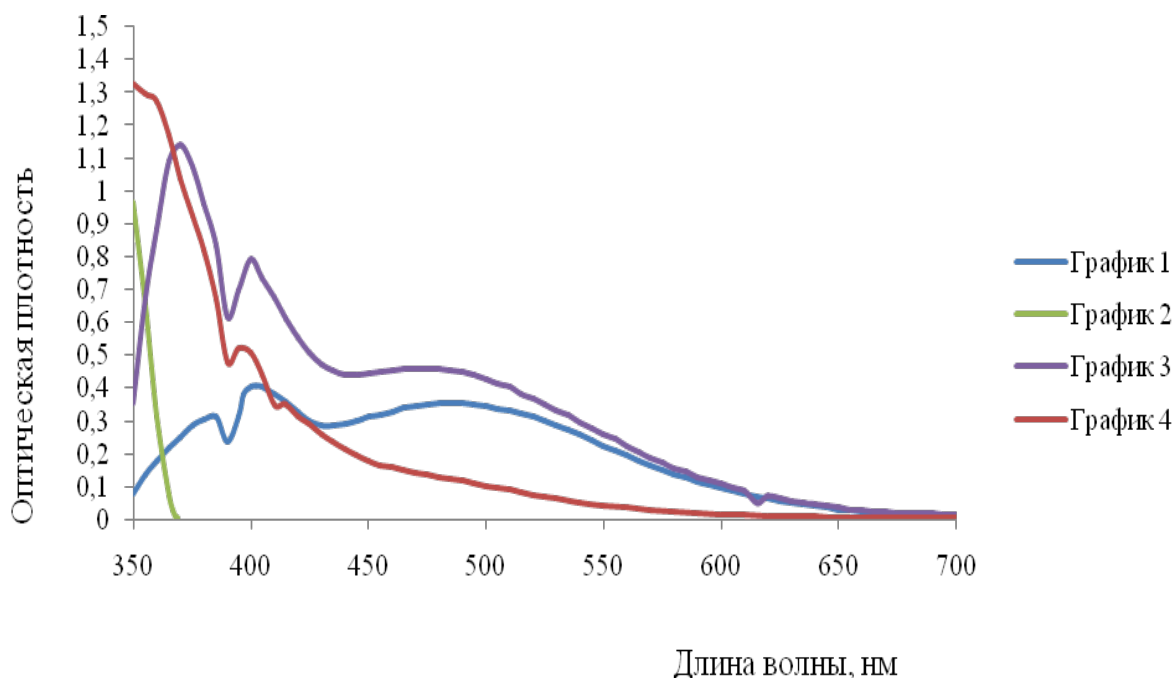


Рисунок 4.4 - Спектры поглощения продукта реакции КОН-1 – железа(III) хлорид относительно растворов железа(III) хлорида (1) и КОН-1(3); спектры поглощения растворов железа(III) хлорида (4) и КОН-1 (2).

Спектр поглощения продукта реакции КОН-1-железо(III) характеризуется наличием двух максимумов поглощения при 400 нм и 480 нм. Первый интенсивный максимум обусловлен поглощением раствора железа(III) хлорида и самого КОН-1. При 480 нм железа(III) хлорид обладает незначительным поглощением - оптическая плотность не превышает 0,03. Поэтому в качестве аналитической длины волны для КОН-1 выбрана 480 нм; в качестве раствора сравнения необходимо использовать раствор железа(III) хлорида соответствующей концентрации.

### 4.3.2. Изучение влияния количества воды на образование продукта реакции КОН-1 - железо(III)

Для проверки влияния количества воды на протекание реакции между КОН-1 и железа(III) хлоридом измерена оптическая плотность их продукта реакции в присутствии различного количества воды: от 0 до 10 мл.

Методика. По 3 мл раствора А (раздел 4.3.1) помещали в мерные колбы вместимостью 25 мл, прибавляли по 1 мл 1% спиртового раствора железа(III) хлорида, разное количество воды от 0 до 10 мл, доводили объём раствор до метки диметилформамидом и перемешивали.

В качестве раствора сравнения использовали соответствующий раствор, содержащий диметилформамид и то же количество 1% спиртового раствора железа(III) хлорида, что и анализируемые растворы. Результаты приведены на рисунке 4.5.

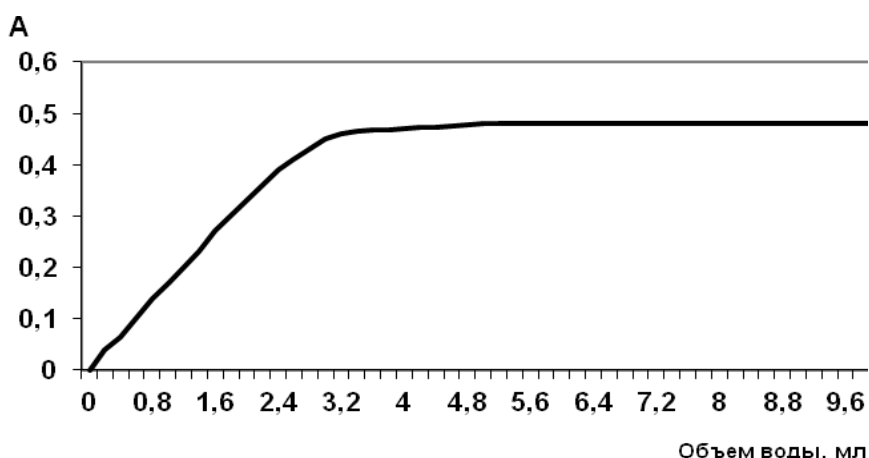


Рисунок 4.5 - Зависимость оптической плотности продукта реакции КОН-1 – железо(III) от количества воды в реакционной массе

Установлено, что для образования продукта реакции КОН-1 - железо (III) необходимо присутствие воды. Полное образование продукта реакции происходит при добавлении не менее 3 мл воды в 25 мл реакционной смеси. Таким образом, вода входит в состав продукта реакции.

### 4.3.3. Определение устойчивости продукта реакции КОН-1 – железо (III)

Измерена оптическая плотность продукта реакции КОН-1 с железа(III) хлоридом в течение 2 ч (с интервалом 5 мин).

Методика. 3 мл раствора А (раздел 4.3.1) помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 1 мл 1% раствора железа(III) хлорида, доводили объём раствора водой до метки и перемешивали.

В качестве раствора сравнения использовали раствор: в мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 3 мл диметилформаида, 1 мл 1% раствора железа(III) хлорида, доводили объём раствора водой до метки и перемешивали. Результаты представлены на рисунке 4.6:

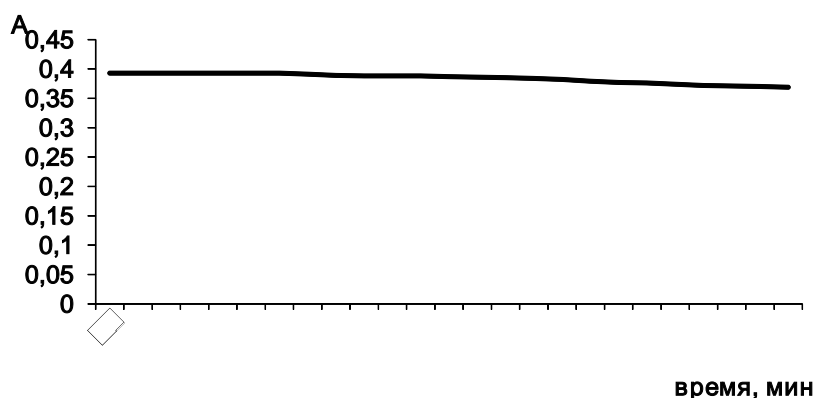


Рисунок 4.6 - Устойчивость продукта реакции КОН-1 – железо(III)

По полученным данным можно сделать вывод, что образование окрашенного продукта реакции происходит практически сразу же после добавления основного реагента. Данный продукт достаточно устойчив во времени. Полученный раствор рекомендуется использовать для анализа в течение 30 мин; в дальнейшем наблюдается незначительное снижение оптической плотности.



#### 4.3.4. Изучение состава и оптимальных условий образования продукта реакции КОН–1 – железо(III)

Для изучения состава были использованы методы изомолярных серий и молярных отношений [10, 13]. Концентрация исходного раствора КОН – 1 и реактива составляла 0,003 моль/л, объем фотометрируемых растворов 25 мл.

Методика. *Приготовление исходного раствора КОН-1:* 0,0532 г субстанции помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 20 мл диметилформамида, доводили объём раствора до метки диметилформамидом и перемешивали

*Приготовление исходного раствора железа(III) хлорида:* 5,80 мл 1,40% водного раствора железа(III) хлорида помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объём раствора водой до метки и перемешивали.

В мерные колбы вместимостью 25 мл помещали от 1 до 5 мл 0,003 М раствора КОН-1, прибавляли диметилформамид (до суммарного объема 5 мл), добавляли от 5 до 1 мл 0,003 М раствора железа(III) хлорида, доводили объём раствора водой до метки и перемешивали. У полученных растворов измеряли оптическую плотность при длине волны 480 нм в кювете с толщиной слоя 1 см.

В качестве раствора сравнения использовали контрольный опыт: в мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 5 мл диметилформамида, соответствующий объём 0,003 М раствора железа(III) хлорида, доводили объём раствора водой до метки и перемешивали. Результаты представлены на рисунке 4.7.

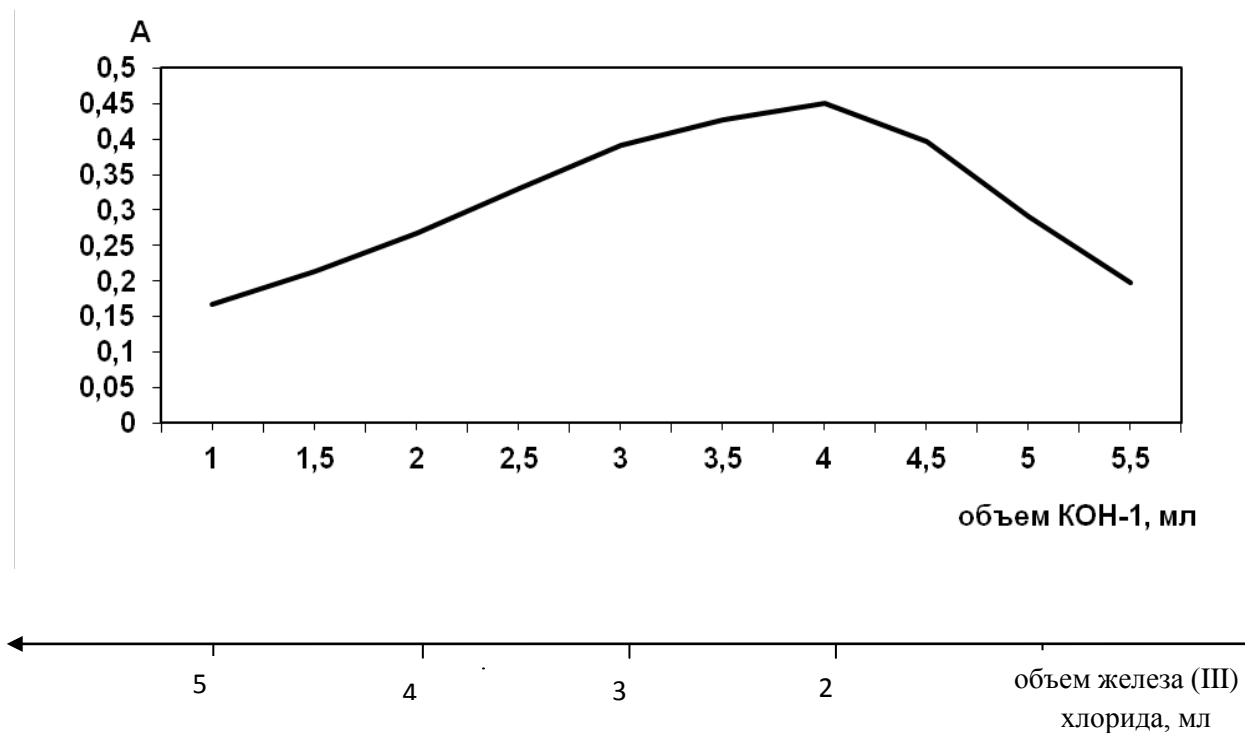


Рисунок 4.7 - Зависимость оптической плотности продукта реакции КОН-1 и железа (III) хлорида от состава изомолярного раствора

Для проверки зависимости оптической плотности продукта реакции от концентрации раствора железа(III) хлорида были использованы те же 0,003 М растворы КОН-1 и железа(III) хлорида.

Методика. В мерные колбы вместимостью 25 мл помещали по 3 мл 0,003 М раствора КОН-1, добавляли в разных опытах от 0,1 до 3 мл 0,003 М раствора железа(III) хлорида, доводили объём раствора водой до метки и перемешивали. У полученных растворов измеряли оптическую плотность при длине волны 480 нм в кювете с толщиной слоя 1 см.

В качестве раствора сравнения использовали контрольный опыт: в мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 3 мл диметилформамида, соответствующий объём 0,003 М раствора железа(III) хлорида, доводили водой до метки и перемешивали. Результаты представлены на рисунке 4.8.

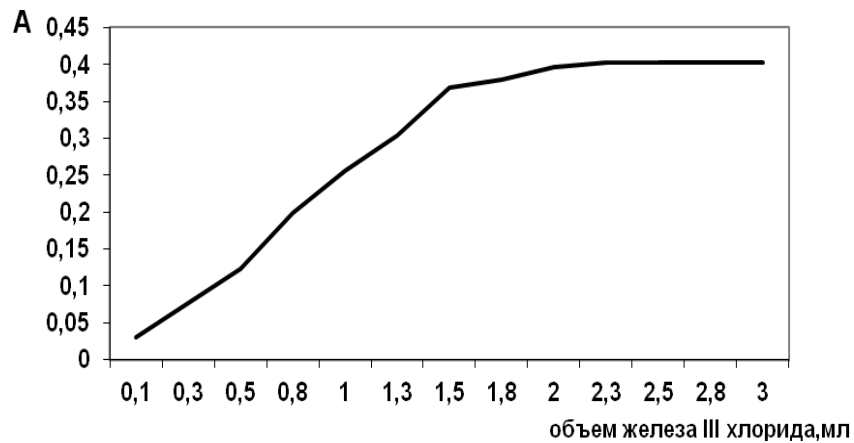


Рисунок 4.8 - Зависимость оптической плотности от концентрации железа(III) хлорида (объем раствора КОН-1 – 3 мл)

Установлено, что КОН-1 взаимодействует с железа(III) хлоридом в соотношении 2:1. Для полноты протекания реакции КОН-1 – железо(III) необходим не менее чем 1,5-кратный избыток реактива. Дальнейшее введение реактива в раствор КОН-1 не влияет на величину оптической плотности и не мешает определению.

Проведённые исследования [38] подтверждают предположение, что в ходе реакции образуется комплексное соединение КОН-1 с железом(III) по енольному гидроксилу (рис. 4.9).

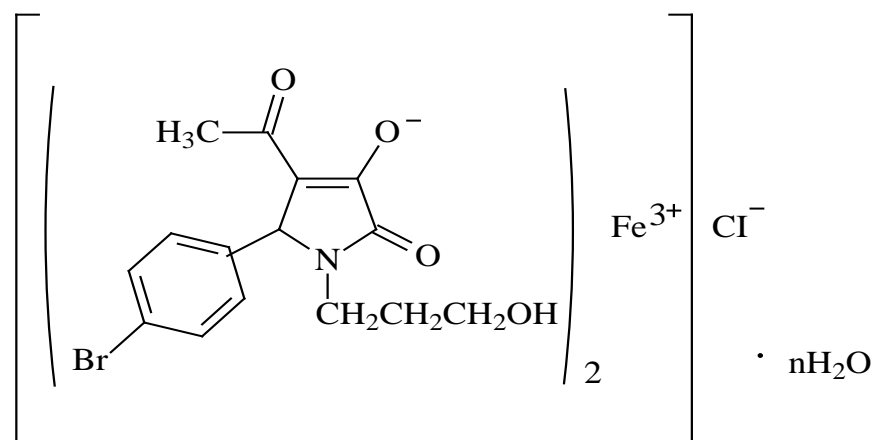


Рисунок 4.9 - Предполагаемое строение продукта реакции КОН-1 –железа(III) хлорид

#### 4.3.5. Валидация разработанной методики

На основании проведенных исследований предложена методика спектрофотометрического определения КОН-1 на основе его реакции с железом(III) хлоридом [38, 45].

Методика. Около 0,05 г (точная навеска) субстанции, предварительно высушенной до постоянной массы при температуре 100-105 °С, помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 20 мл диметилформамида, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор А). 3 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 мл 1% раствора железа(III) хлорида, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают. У полученного раствора измеряют оптическую плотность при длине волны 480 нм в кювете с толщиной слоя 1 см.

В качестве раствора сравнения используют контрольный опыт: в мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 3 мл диметилформамида, 1 мл 1% раствора железа(III) хлорида, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают.

Для оценки пригодности предлагаемой методики проведена её валидация по показателям: линейность результатов, предел обнаружения, правильность и сходимости в аналитической области методики, избирательность.

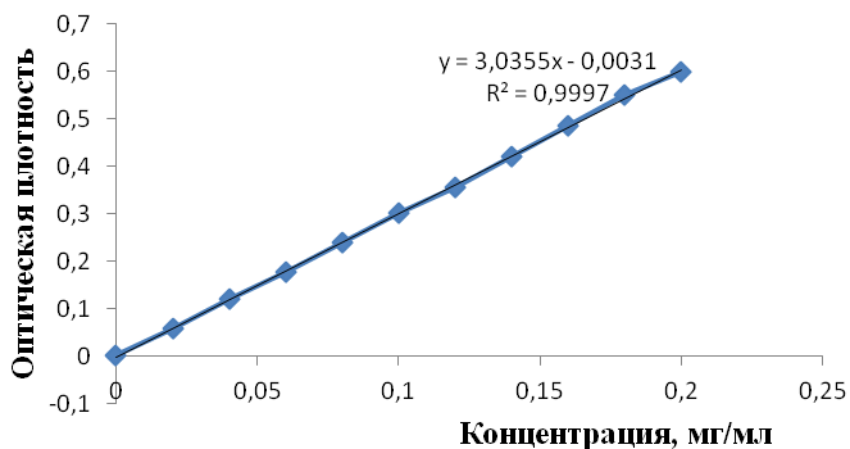
##### *Линейность (проверка соблюдения основного закона светопоглощения)*

В разных опытах брали от 0,5 до 5,0 мл раствора А, прибавляли диметилформамид до 5,0 мл. Результаты исследования приведены в таблице 4.14. и на рисунке 4.10.

Установлено, что график зависимости оптической плотности от концентрации имеет линейный характер в пределах концентраций КОН–1 0,02 – 0,2 мг/мл.

**Таблица 4.14 - Показатели калибровочного графика продукта реакции  
КОН–1 - железо(III)**

| Концентрация КОН-1 |       | Оптическая плотность раствора продукта реакции | Удельный показатель поглощения |
|--------------------|-------|--|--------------------------------|
| мг/мл              | %     |  |                                |
| 0,02               | 0,002 | 0,057  | 28,50                          |
| 0,04               | 0,004 | 0,119  | 29,75                          |
| 0,06               | 0,006 | 0,176  | 29,33                          |
| 0,08               | 0,008 | 0,239  | 29,87                          |
| 0,1                | 0,01  | 0,301  | 30,10                          |
| 0,12               | 0,012 | 0,357  | 29,42                          |
| 0,14               | 0,014 | 0,421  | 30,07                          |
| 0,16               | 0,016 | 0,485  | 30,31                          |
| 0,18               | 0,018 | 0,550  | 30,56                          |
| 0,2                | 0,02  | 0,600  | 30,00                          |



**Рисунок 4.10 - Зависимость оптической плотности от концентрации КОН-1**

### Повторяемость (сходимость) результатов

Устанавливали по результатам 7 параллельных определений (таблица 4.15). Оценка повторяемости (сходимости) показала, что относительная ошибка результата отдельного определения не превышает  $\pm 0,906\%$ .

**Таблица 4.15 - Оценка повторяемости (сходимости) результатов**

| №                | Навеска субстанции, КОН-1, г | Оптическая плотность раствора | Удельный показатель поглощения | Молярный показатель поглощения | Метрологические данные (для оптической плотности)   |
|------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---|
| 1                | 0,0500                       | 0,381                         | 31,75                          | 1125                           | $X_{\text{средн}} = 0,381$<br>$S = 0,0014$<br>$Sx_{\text{средн}} = 0,00053$<br>$\Delta X = 0,0035$<br>$\Delta X_{\text{средн}} = 0,0013$<br>$\varepsilon = \pm 0,91\%$<br>$\varepsilon_{\text{средн}} = \pm 0,34\%$ |
| 2                | 0,0500                       | 0,382                         | 31,83                          | 1127                           |   |
| 3                | 0,0500                       | 0,379                         | 31,58                          | 1119                           |   |
| 4                | 0,0500                       | 0,382                         | 31,83                          | 1127                           |   |
| 5                | 0,0500                       | 0,379                         | 31,58                          | 1119                           |   |
| 6                | 0,0500                       | 0,380                         | 31,67                          | 1122                           |   |
| 7                | 0,0500                       | 0,382                         | 31,83                          | 1127                           |   |
| Среднее значение |                              | 0,381                         | 31,75                          | 1125                           |   |

### Предел обнаружения КОН-1

Определяли расчетным методом [10, 13, 91], используя цифровые данные удельных и молярных показателей поглощения, приняв  $D_{\text{min}} 0,025$ .

Результаты приведены в табл. 4.16. Методика достаточно чувствительна для анализа КОН-1 в лекарственных препаратах.

**Таблица 4.16 - Предел обнаружения КОН-1**

| Показатели поглощения |          | Предел обнаружения |          |
|-----------------------|----------|--------------------|----------|
| Удельный              | Молярный | мкг/мл             | мкмоль/л |
| 31,75                 | 1125     | 7,87               | 22,2     |

### Правильность результатов

Оценка осуществлялась путем статистической обработки выборок, полученных в ходе количественного анализа субстанции КОН-1 в модельных пробах на трех уровнях концентрации в пределах рекомендуемой аналитической области методики (80,100,120% от количества принятого за 100%-0,05г), двумя способами:

- в первом случае брали разные навески субстанции КОН-1 (0,0400 г– 80%, 0,0500 г – 100%, 0,0600 г– 120%) – способ 1;
- во втором - разные аликвоты раствора А (2,5 мл – 80%, 3,0 мл – 100%, 3,5 мл – 120%) – способ 2.

Результаты анализов представлены в таблицах 4.17 – 4.20.

**Таблица 4.17- Оценка правильности разработанной методики на трех уровнях концентраций КОН-1 (способ 1)**

| № опыта     | Навеска КОН-1, г | Концентрация КОН-1 в фотометрируемом растворе, мг/мл | Оптическая плотность    | Метрологические данные (для оптической плотности)  |
|-------------|------------------|--|-------------------------|--|
| 1<br>(80%)  | 0,0400           | 0,096  | 0,309<br>0,311<br>0,309 | $X_{\text{средн}} = 0,310$<br>$S = 0,00122$<br>$Sx_{\text{средн}} = 0,00071$<br>$\Delta X = 0,0053$<br>$\Delta X_{\text{средн}} = 0,0030$<br>$\varepsilon = \pm 1,69\%$<br>$\varepsilon_{\text{средн}} = \pm 0,97\%$ |
| 2<br>(100%) | 0,0500           | 0,120  | 0,376<br>0,375<br>0,377 | $X_{\text{средн}} = 0,376$<br>$S = 0,001$<br>$Sx_{\text{средн}} = 0,00058$<br>$\Delta X = 0,0043$<br>$\Delta X_{\text{средн}} = 0,0025$<br>$\varepsilon = \pm 1,14\%$<br>$\varepsilon_{\text{средн}} = \pm 0,66\%$   |
| 3<br>(120%) | 0,0600           | 0,144  | 0,451<br>0,452<br>0,450 | $X_{\text{средн}} = 0,451$<br>$S = 0,001$<br>$Sx_{\text{средн}} = 0,00058$<br>$\Delta X = 0,0043$<br>$\Delta X_{\text{средн}} = 0,0025$<br>$\varepsilon = \pm 0,95\%$<br>$\varepsilon_{\text{средн}} = \pm 0,55\%$   |

**Таблица 4.18 - Оценка правильности разработанной методики в пределах рекомендуемой аналитической области (способ 1)**

| № | Навеска КОН-1, г | Оптическая плотность | Оптическая плотность (в перерасчете на 100% навеску КОН-1) | Метрологическая характеристика  |
|---|------------------|----------------------|--|---|
| 1 | 0,0400           | 0,309                | 0,386  | $X_{\text{средн}} = 0,380$<br>$S = 0,0055$<br>$Sx_{\text{средн}} = 0,00183$<br>$\Delta X = 0,0129$<br>$\Delta X_{\text{средн}} = 0,0043$<br>$\varepsilon = \pm 3,39\%$<br>$\varepsilon_{\text{средн}} = \pm 1,13\%$ |
| 2 | 0,0400           | 0,311                | 0,388  |   |
| 3 | 0,0400           | 0,309                | 0,386  |   |
| 4 | 0,0500           | 0,376                | 0,376  |   |
| 5 | 0,0500           | 0,375                | 0,375  |   |
| 6 | 0,0500           | 0,377                | 0,377  |   |
| 7 | 0,0600           | 0,451                | 0,376  |   |
| 8 | 0,0600           | 0,452                | 0,377  |   |
| 9 | 0,0600           | 0,450                | 0,375  |   |

**Таблица 4.19 - Оценка правильности разработанной методики на трех уровнях концентраций КОН-1 (способ 2)**

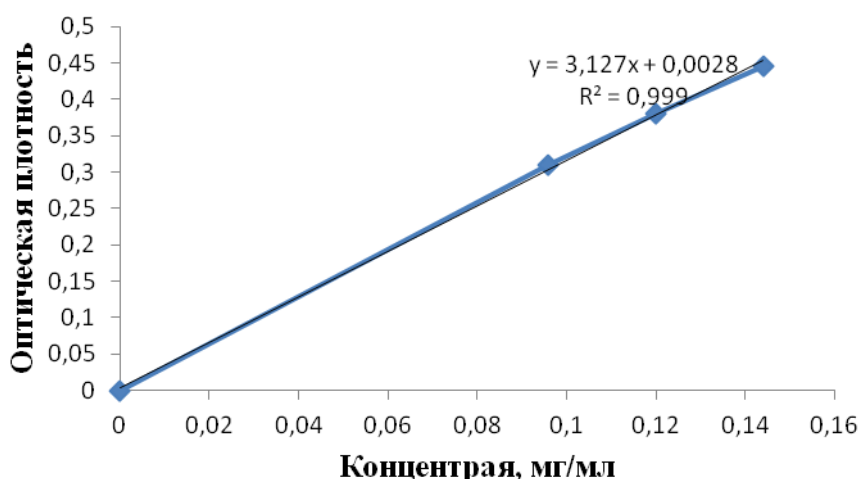
| № опыта     | Объем раствора А, мл | Концентрация КОН-1 в фотометрируемом растворе, мг/мл | Оптическая плотность    | Метрологические данные (для оптической плотности)  |
|-------------|----------------------|--|-------------------------|--|
| 1<br>(80%)  | 2,5                  | 0,096  | 0,318<br>0,320<br>0,319 | $X_{\text{средн}} = 0,319$<br>$S = 0,001$<br>$Sx_{\text{средн}} = 0,00058$<br>$\Delta X = 0,0043$<br>$\Delta X_{\text{средн}} = 0,0025$<br>$\varepsilon = \pm 1,35\%$<br>$\varepsilon_{\text{средн}} = \pm 0,78\%$   |
| 2<br>(100%) | 3,0                  | 0,120  | 0,381<br>0,382<br>0,381 | $X_{\text{средн}} = 0,381$<br>$S = 0,00707$<br>$Sx_{\text{средн}} = 0,00041$<br>$\Delta X = 0,0031$<br>$\Delta X_{\text{средн}} = 0,0018$<br>$\varepsilon = \pm 0,79\%$<br>$\varepsilon_{\text{средн}} = \pm 0,46\%$ |
| 3<br>(120%) | 3,5                  | 0,144  | 0,446<br>0,445<br>0,446 | $X_{\text{средн}} = 0,446$<br>$S = 0,00707$<br>$Sx_{\text{средн}} = 0,00041$<br>$\Delta X = 0,0031$<br>$\Delta X_{\text{средн}} = 0,0017$<br>$\varepsilon = \pm 0,68\%$<br>$\varepsilon_{\text{средн}} = \pm 0,46\%$ |



**Таблица 4.20 - Оценка правильности разработанной методики в пределах рекомендуемой аналитической области (способ 2)**

| № | Объем раствора А, мл | Оптическая плотность | Оптическая плотность (в перерасчете на 100% навеску КОН-1) | Метрологическая характеристика   |
|---|----------------------|----------------------|--|--|
| 1 | 2,5                  | 0,318                | 0,381  | $X_{\text{средн}} = 0,382$<br>$S = 0,001$<br>$Sx_{\text{средн}} = 0,00033$<br>$\Delta X = 0,0024$<br>$\Delta X_{\text{средн}} = 0,0008$<br>$\varepsilon = \pm 0,62\%$<br>$\varepsilon_{\text{средн}} = \pm 0,21\%$ |
| 2 | 2,5                  | 0,320                | 0,384  |  |
| 3 | 2,5                  | 0,319                | 0,382  |  |
| 4 | 3,0                  | 0,381                | 0,381  |  |
| 5 | 3,0                  | 0,382                | 0,382  |  |
| 6 | 3,0                  | 0,381                | 0,381  |  |
| 7 | 3,5                  | 0,446                | 0,382  |  |
| 8 | 3,5                  | 0,445                | 0,381  |  |
| 9 | 3,5                  | 0,446                | 0,382  |  |

Данные, приведенные в таблицах 4.16 – 4.19 показывают, что на каждом уровне концентрации КОН-1 и в целом в пределах рекомендуемой аналитической области методики получены сходимые результаты. Поэтому по полученным данным (методики 1 и 2) построен график зависимости оптической плотности от концентрации раствора КОН-1 (рис. 4.11). Линия тренда пересекает ось «Оптическая плотность» в точке 0, что свидетельствует о правильности разработанной методики.



**Рисунок 4.11 - Зависимость оптической плотности от концентрации раствора КОН-1**

### *Избирательность*

*(апробация методики для определения КОН-1 в грануляте состава:*

*КОН-1; лактоза; ПВП)*

Готовили модельную смесь, содержащую равные количества компонентов гранулята (навески брали на весах аналитических).

Методика. 0,1500 г (точную навеску) модельной смеси помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 20 мл диметилформамида, перемешивали в течение 1 мин. Объем раствора в мерной колбе доводили до метки диметилформамидом, перемешивали и фильтровали через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А).

3 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, и далее поступали, как указано в основной методике.

Параллельно измеряли оптическую плотность раствора РСО (субстанции КОН-1, использованной для изготовления модельной смеси) (приготовление раствора, как в основной методике).

Количество КОН-1 в грануляте (X, г) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot a_0 \cdot 3 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 3 \cdot 50 \cdot 25} = \frac{A \cdot a_0 \cdot P}{A_0 \cdot a}, \text{ где}$$

A – оптическая плотность раствора модельной смеси;

A<sub>0</sub> – оптическая плотность раствора РСО;

a<sub>0</sub> – навеска РСО, г (0,0500 г);

a – навеска модельной смеси, г (0,1500 г);

P – условная общая масса модельной смеси, г (0,1500 г).

Результаты представлены в таблице 4.21.

**Таблица 4.21 - Метрологическая характеристика разработанной методики для определения КОН-1 в грануляте**

| Оптическая плотность раствора модельной смеси | Оптическая плотность раствора РСО | Определено КОН-1 в модельной смеси, г | Метрологическая характеристика   |
|---|-----------------------------------|---------------------------------------|--|
| 0,364   | 0,368                             | 0,0495                                | $X_{\text{средн}} = 0,0495$<br>$S = 0,000612$<br>$Sx_{\text{средн}} = 0,00027$<br>$\Delta X = 0,0017$<br>$\Delta X_{\text{средн}} = 0,0008$<br>$\varepsilon = \pm 3,43\%$<br>$\varepsilon_{\text{средн}} = \pm 1,52\%$ |
| 0,361   |                                   | 0,0490                                |  |
| 0,360   |                                   | 0,0489                                |  |
| 0,368   |                                   | 0,0500                                |  |
| 0,370   |                                   | 0,0503                                |  |

Разработанная методика дает точные (правильные и сходимые) результаты; обладает достаточной чувствительностью и избирательностью; проста в исполнении, не требуют дорогостоящих, токсичных реагентов. Методика рекомендована для количественного определения КОН-1 в составе гранулята.

## ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4

1. Рассчитанные по результатам потенциометрического титрования значения  $pK_a$  в водно-спиртовом и водно-диметилформамидном растворах составили  $3,21 \pm 0,03$  и  $4,85 \pm 0,07$ , соответственно, что свидетельствует о достаточно сильных кислотных свойствах КОН-1. Диметилформамид уменьшает диссоциацию енольной гидроксильной группы в изучаемом соединении. На кривых титрования КОН-1 наблюдался один скачок в области pH 6,5-9,4.

2. При визуальном определении точки эквивалентности рекомендуется использовать фенолфталеин, имеющий более четкий переход окраски индикатора. В качестве растворителя субстанции выбран спирт 96%, повышающий кислотные свойства КОН-1.

3. Разработана методика алкалиметрического определения субстанции КОН-1. Пригодность методики доказана её валидацией по показателям: линейность результатов, правильность и сходимость в аналитической области. Относительная ошибка среднего результата не превышает  $\pm 0,20\%$ .

4. Количественное определение пяти серий субстанции КОН-1 показало, что содержание исследуемого соединения в субстанции составляет не менее 99,5%. Методика включена в проект ФСП на субстанцию КОН-1.

5. Разработана и валидирована спектрофотометрическая методика определения КОН-1. График зависимости оптической плотности от концентрации раствора КОН-1 имеет линейный характер в области 2 – 20 мкг/мл и описывается уравнением регрессии:  $Y=0,0406X+0,0041$ . Предел обнаружения КОН-1 - 0,6 мкг/мл. Относительная ошибка среднего результата не превышает  $\pm 0,76\%$ . Методика может быть использована в анализе лекарственных препаратов изучаемого БАС, т. к. обладает достаточной чувствительностью и специфичностью.

6. Спектр поглощения продукта реакции КОН-1 с 1% раствором железа(III) хлорида в интервале длин волн от 350 до 700 нм характеризуется

наличием двух максимумов поглощения при 400 и 480 нм. В качестве аналитической длины волны для КОН-1 выбрана 480 нм.

7. Изучены состав и оптимальные условия образования продукта реакции КОН-1 – железо(III) методами изомолярных серий и молярных отношений. Установлено, что КОН-1 взаимодействует с железа(III) хлоридом в соотношении 2:1. Для полноты протекания реакции КОН-1 – железа(III) хлорид необходим не менее чем 1,5 кратный избыток реактива. Для образования продукта реакции КОН-1 - железа(III) необходимо присутствие воды в реакционной смеси.

8. Разработана и валидирована спектрофотометрическая методика количественного определения КОН-1 на основе его реакции железа(III) хлоридом. График зависимости оптической плотности от концентрации имеет линейный характер в пределах концентраций КОН-1 0,02 – 0,2 мг/мл; предел обнаружения КОН-1 составляет 7,86 мкг/мл. Относительная ошибка результата отдельного определения не превышает  $\pm 0,906\%$ . Исследования, проведенные на трех уровнях концентрации КОН-1, свидетельствует о правильности методики. Методика избирательна и может быть использована для количественного определения соединения КОН-1 в составе гранулята, содержащего лактозу и ПВП.

## **ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОСТОРОННИХ (СПЕЦИФИЧЕСКИХ) ПРИМЕСЕЙ В СУБСТАНЦИИ КОН-1**

Исходя из схемы получения соединения КОН-1 (глава 1), возможными посторонними (специфическими) примесями в её субстанции являются 3-аминопропанол (3-АПР), метиловый эфир ацетилпировиноградной кислоты (МЭАПВК) и 4-бромбензальдегид (4-ББА). Для определения посторонних примесей МЭАПВК и 4-ББА в субстанции КОН-1 оптимальным является метод обращённо-фазной ВЭЖХ. Для определения примеси 3-АПР – выбран спектрофотометрический метод в видимой области как наиболее простой, достаточно точный, не требующий дорогих и токсичных реактивов. Для получения окрашенного продукта использована реакция с нингидрином.

### **5.1. Разработка методики определения примеси 3-АПР в субстанции КОН-1**

#### **5.1.1. Спектры поглощения продукта реакции 3-АПР с нингидрином**

Методика. 0,1 мл 3-АПР помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в воде, доводили объём раствора до метки тем же растворителем и перемешивали. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 30 мл полученного раствора, растворяли в воде, доводили объём раствора до метки тем же растворителем и перемешивали (раствор А).

2 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 4 мл фосфатного буферного раствора (рН от 6,0 до 7,2), 2 мл 1% раствора нингидрина в спирте этиловом 96% и нагревали содержимое колбы на кипящей водяной бане в течение 30 мин, быстро охлаждали, доводили объём мерной колбы водой до метки и перемешивали.

Снимали спектры поглощения продуктов реакции 3-АПР - нингидрин, полученных при различных значениях рН, 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 [131].

Спектры, показанные на рисунке 5.1, характеризуются двумя четко выраженными максимумами поглощения при длинах волн  $400 \pm 2$  нм и  $568 \pm 2$  нм и одним минимумом, лежащем в области 455-465 нм. Положение максимумов практически не зависит от рН буферного раствора.

В качестве аналитической волны для 3-АПР была выбрана 568 нм.

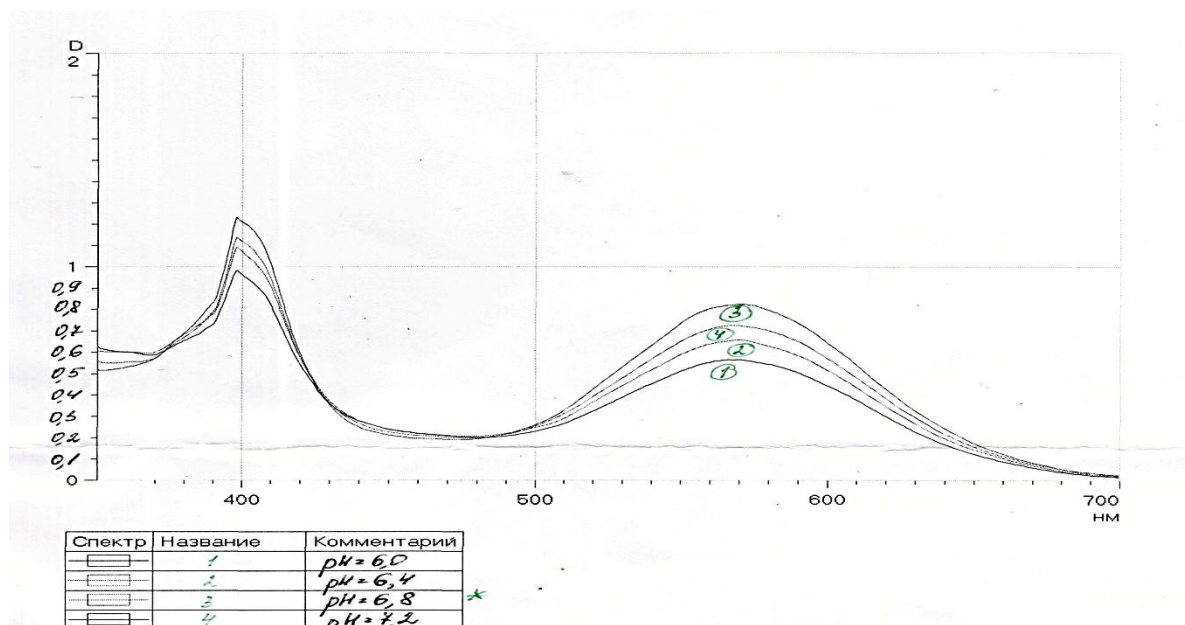


Рисунок 5.1 - Спектры поглощения продукта реакции 3-АПР-нингидрин, полученного при различных значениях рН.

Оптическая плотность растворов продуктов реакции 3-АПР - нингидрин при длине волны 568 нм приведена в таблице 5.1.

**Таблица 5.1 - Выбор оптимального значения рН**

| Оптическая плотность продукта реакции при рН |       |       |       |              |       |       |       |
|--|-------|-------|-------|--------------|-------|-------|-------|
| 6,0  | 6,2   | 6,4   | 6,6   | 6,8          | 7,0   | 7,2   | 7,4   |
| 0,340  | 0,486 | 0,670 | 0,746 | <b>0,772</b> | 0,692 | 0,655 | 0,566 |

Реакция среды существенно влияет на интенсивность поглощения, максимальная оптическая плотность достигается при значении рН 6,8 (оптимальное значение рН).

### **5.1.2. Исследование влияния восстановителя на интенсивность и стабильность поглощения продукта реакции 3-АПР с нингидрином.**

Анализ литературных данных [47, 49, 77] показал, что восстанавливающие вещества повышают чувствительность реакции алифатических аминов с нингидрином. 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.

Измеряли оптическую плотность продуктов реакции 3-АПР – нингидрин, полученных при оптимальном значении рН, при длине волны 568 нм. Реакцию проводили в двух вариантах: без добавления и с добавлением аскорбиновой кислоты. Результаты опытов представлены в таблице 5.2.

Введение аскорбиновой кислоты в реакционную массу не изменяет характера спектра поглощения продукта реакции 3-АПР – нингидрин, но значительно увеличивает интенсивность светопоглощения [89].



**Таблица 5.2 - Влияние аскорбиновой кислоты на интенсивность поглощения продуктов реакции 3-АПР – нингидрин**

| Оптическая плотность продуктов реакции 3-АПР – нингидрин |                                    |
|--|------------------------------------|
| Без добавления аскорбиновой кислоты                      | С добавлением аскорбиновой кислоты |
| 0,101  | 0,485 (+ 380%)                     |

### 5.1.3. Валидация разработанной методики

На основании проведенных исследований предложена методика спектрофотометрического определения 3-АПР на основе его реакции с нингидрином.

Для оценки пригодности предлагаемой методики проведена её валидация по показателям: линейность результатов, предел обнаружения, избирательность, внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность.

*Линейность (проверка соблюдения основного закона светопоглощения)*

Методика. 0,1 мл 3-АПР помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в воде, доводили объём раствора до метки тем же растворителем и перемешивали (раствор А). 7,5 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объём раствора до метки тем же растворителем и перемешивали (раствор Б).

Далее ставили 2 серии опытов.

**1 серия.** В мерные колбы вместимостью 50 мл помещали переменный объём раствора Б (0,5-3,0 мл), прибавляли воду до общего объёма 3,0 мл, 4 мл фосфатного буферного раствора рН 6,8, 2 мл 1% раствора нингидрина в спирте этиловом 96%, 2 мл воды. Содержимое колб нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин, быстро охлаждали, доводили объём колб

водой до метки и перемешивали. У полученных растворов измеряли оптическую плотность при длине волны 568 нм в кювете толщиной 1 см.

В качестве раствора сравнения использовали контрольный опыт: в мерную колбу вместимостью 50 мл помещали 5 мл воды, 4 мл фосфатного буферного раствора рН 6,8, 2 мл 1% раствора нингидрина в спирте этиловом 96%. Содержимое колбы нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин, быстро охлаждали, доводили объем колбы водой до метки и перемешивали.

**2 серия.** В мерные колбы вместимостью 50 мл помещали те же реагенты, что и в *1 серии*, но вместо 2 мл воды прибавляли 2 мл 0,05% раствора аскорбиновой кислоты, далее следовали методике.

Полученные результаты приведены в таблицы 5.3.

**Таблица 5.3 - Показатели калибровочных графиков продукта реакции 3-АПР с нингидрином**

| Объем раствора Б, мл | Объем воды, мл | Концентрация 3-АПР в фотометрируемом растворе |        | Оптическая плотность фотометрируемого раствора |         |
|----------------------|----------------|---|--------|--|---------|
|                      |                | %   | мкг/мл | Серия 1  | Серия 2 |
| 0,5                  | 2,5            | 0,000075                                      | 0,75   | 0,016  | 0,115   |
| 1,0                  | 2,0            | 0,000150                                      | 1,50   | 0,028  | 0,232   |
| 1,5                  | 1,5            | 0,000225                                      | 2,25   | 0,017  | 0,345   |
| 2,0                  | 1,0            | 0,000300                                      | 3,00   | 0,101  | 0,485   |
| 2,5                  | 0,5            | 0,000375                                      | 3,75   | 0,141  | 0,586   |
| 3,0                  | 0              | 0,000450                                      | 4,50   | 0,582  | 0,713   |

Построены графики зависимости оптической плотности (А) от концентрации фотометрируемых растворов (С, мкг/мл) (рисунок 5.2).

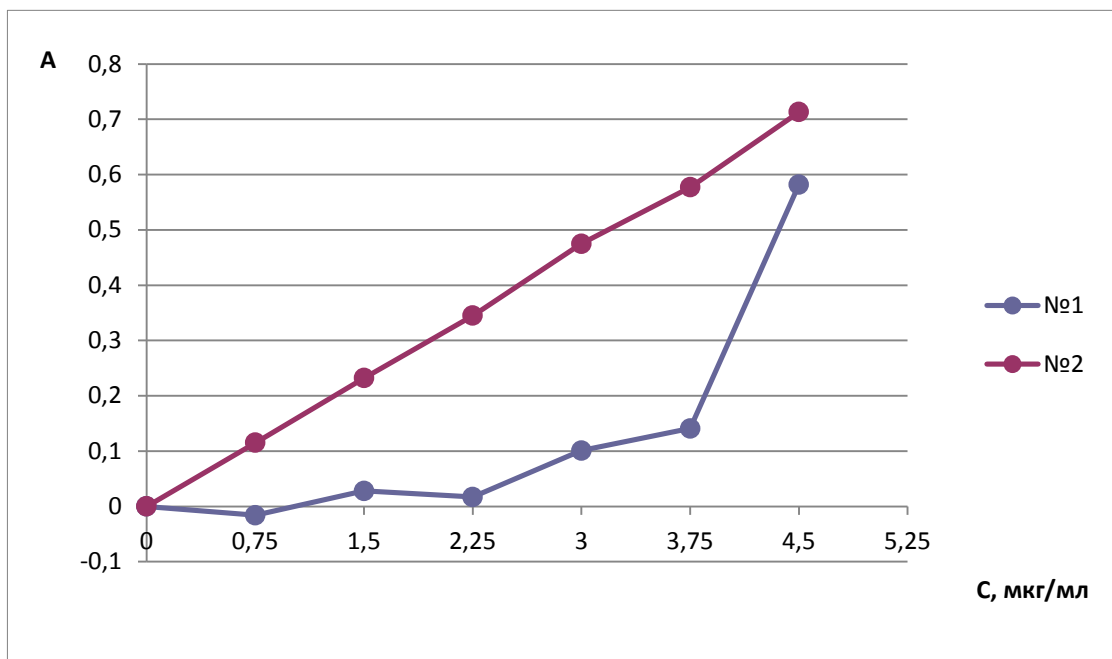


Рисунок 5.2 - Калибровочный график продукта реакции 3-АПР-нингидрин

Исследования показали, что введение аскорбиновой кислоты в реакционную массу значительно увеличивает интенсивность светопоглощения, придаёт зависимости оптической плотности от концентрации линейный характер. Область линейности графика составляет 0,75-4,50 мкг/мл. Поэтому, в дальнейших опытах продукты реакции 3-АПР с нингидрином получали в присутствии аскорбиновой кислоты.

#### *Предел обнаружения 3-АПР*

Рассчитаны молярный и удельный показатели поглощения для продукта реакции 3-АПР с нингидрином. Пределы обнаружения 3-АПР спектрофотометрическим методом по реакции с нингидрином (с добавлением аскорбиновой кислоты) определяли расчетным методом [4], используя цифровые данные удельных и молярных показателей поглощения, приняв  $D_{\min}$  0,025. Результаты представлены в таблице 5.4.

Установлено, что исследуемая реакция достаточно чувствительна, поэтому может быть использована для определения примеси 3-АПР в субстанции КОН-1.

**Таблица 5.4 - Пределы обнаружения 3-АПР**

| Показатели поглощения |          | Предел обнаружения |          |
|-----------------------|----------|--------------------|----------|
| Удельный              | Молярный | мкг/мл             | мкмоль/л |
| 1620                  | 12200    | 0,155              | 2,05     |

### *Избирательность*

Для исследования избирательности методик использован метод дифференциальной спектрофотометрии (или метод добавок), т.к. содержание примеси в исследуемой субстанциях низкое. Этот метод позволяет уменьшить погрешность измерения. Метод заключается в добавлении к исследуемому образцу известного количества стандартного раствора. Параллельно измеряется оптическая плотность самого стандартного раствора, а затем проводят расчёты.

**Приготовление раствора РСО 3-АПР** (см. приготовление раствора Б в разделе *Линейность*).

Готовили 2 серии растворов в мерных колбах вместимостью 50 мл (по 4 колбы каждая серия).

Методика. 1 серия. По 0,1 г субстанции КОН-1 помещали в пенициллиновые склянки, прибавляли по 5 мл воды, перемешивали в течение 5 мин, фильтровали через бумажный фильтр в мерные колбы вместимостью 50 мл.

В каждую колбу помещали определённый объём раствора РСО 3-АПР (0,5 мл, 1,0 мл, 2,0 мл и 3,0 мл соответственно). Прибавляли воду до общего

объёма 3,0 мл, 4 мл фосфатного буферного раствора рН 6,8, 2 мл 1% раствора нингидрина в спирте этиловом 96%, 2 мл 0,05% раствора аскорбиновой кислоты. Содержимое колб нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин, быстро охлаждали, доводили водой до метки, перемешивали. У полученных растворов измеряли оптическую плотность при длине волны 568 нм в кювете толщиной 1 см.

В качестве *раствора сравнения* использовали контрольный опыт: в мерную колбу вместимостью 50 мл помещали 8 мл воды, 4 мл фосфатного буферного раствора с рН 6,8, и далее поступали, как в основной методике.

**2 серия.** В мерные колбы вместимостью 50 мл вместо водного извлечения из КОН-1 вносили 5 мл воды очищенной, в остальном поступали, как указано в 1 серии.

Результаты исследования представлены на рис. 5.3 и в таблице 5.5.

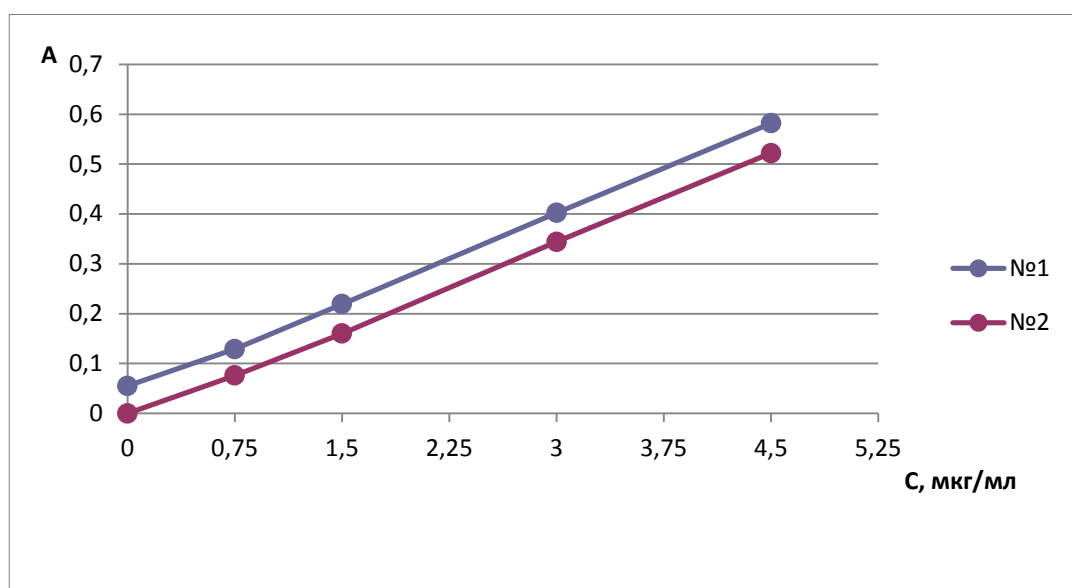


Рисунок 5.3 - Результаты определения примеси 3-АПР в КОН-1 методом дифференциальной спектрофотометрии (серии 1 и 2)

**Таблица 5.5 - Результаты определения примеси 3-АПР в КОН-1 методом дифференциальной спектрофотометрии**

| Объём раствора РСО 3-АПР, мл (V <sub>PCO</sub> ) | Объём воды, мл | Концентрация РСО 3-АПР в фотометрируемом растворе |        | Оптическая плотность фотометрируемого раствора |                           | Оптическая плотность примеси 3-АПР (A <sub>прим</sub> =A-A <sub>0</sub> ) | Содержание примеси 3-АПР в КОН-1*, % |
|--|----------------|---|--------|--|---------------------------|---|--------------------------------------|
|  |                | %   | мкг/мл | 1 серия (A)                                    | 2 серия (A <sub>0</sub> ) |   |                                      |
| 0,5  | 2,5            | 0,000075  | 0,75   | 0,193  | 0,105                     | 0,088   | 0,0314                               |
| 1,0  | 2,0            | 0,000150  | 1,50   | 0,332  | 0,230                     | 0,102   | 0,0333                               |
| 2,0  | 1,0            | 0,000300  | 3,00   | 0,597  | 0,480                     | 0,117   | 0,0366                               |
| 3,0  | 0              | 0,000450  | 4,50   | 0,791  | 0,685                     | 0,106   | 0,0348                               |

C%<sub>ср</sub>=0,0340%

$$c\%_{\text{прим}} = \frac{A_{\text{прим}} \cdot 50 \cdot a_0 \cdot 7,5 \cdot V_{\text{PCO}}}{A_0 \cdot a \cdot 100 \cdot 100 \cdot 50} \cdot 100\% = \frac{A_{\text{прим}} \cdot a_0 \cdot 7,5 \cdot V_{\text{PCO}}}{A_0 \cdot a \cdot 100}$$

где:

A – оптическая плотность смеси РСО 3-АПР и водного извлечения из субстанции;

A<sub>0</sub> – оптическая плотность раствора РСО 3-АПР;

A<sub>прим</sub> – рассчитанная оптическая плотность примеси 3-АПР в субстанции КОН-1;

A<sub>0</sub> – навеска РСО 3-АПР (0,1 мл);

a – навеска субстанции КОН-1 (0,1 г);

V<sub>PCO</sub> – переменный объём раствора РСО 3-АПР (0,5 - 3,0 мл).

*Внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность*

Измерения проводились двумя аналитиками (для создания условий внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности).

**Методика.** 0,1 г субстанции КОН-1 помещали в пенициллиновую склянку, прибавляли 5 мл воды, перемешивали в течение 5 мин, фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 50 мл. В мерную колбу прибавляли 4 мл фосфатного буферного раствора с рН 6,8, 2 мл 1% раствора нингидрина в спирте этиловом 96%, 2 мл 0,05% раствора аскорбиновой кислоты. Содержимое колбы нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин, быстро охлаждали, доводили водой до метки, перемешивали. У полученного раствора измеряли оптическую плотность при длине волны 568 нм в кювете толщиной 1 см.

В качестве *раствора сравнения* использовали контрольный опыт: в мерную колбу вместимостью 50 мл помещали 5 мл воды, 4 мл фосфатного буферного раствора с рН 6,8, и далее поступали, как в основной методике.

Параллельно проводили реакцию с 2,0 мл раствора РСО 3-АПР (см. приготовление раствора Б в разделе *Линейность*); у полученного раствора измеряли оптическую плотность.

Содержание 3-АПР в субстанции КОН-1 в % (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A * 50 * a_0 * 7,5 * 2 * 100}{A_0 * a * 100 * 100 * 50} = \frac{A * a_0 * 0,15}{A_0 * a}$$

где

A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A<sub>0</sub> – оптическая плотность раствора РСО 3-АПР;

a<sub>0</sub> – навеска РСО 3-АПР (0,1 мл);

a – навеска субстанции (0,1 г);

Результаты исследований отражены в таблице 5.6.

**Таблица 5.6 - Метрологическая характеристика разработанной методики для определения примеси 3-АПР в субстанции КОН-1.**

**Аналитик 1.**

| A     | A <sub>0</sub> | X, %   | Метрологическая характеристика   |
|-------|----------------|--------|--|
| 0,102 | 0,485          | 0,0316 | $X_{\text{средн}} = 0,0330$<br>$S = 0,00114$<br>$S_{x \text{ средн}} = 0,00057$<br>$\Delta X = 0,0036$<br>$\Delta X_{\text{средн}} = 0,0018$<br>$\varepsilon = \pm 10,99\%$<br>$\varepsilon_{\text{средн}} = \pm 5,55\%$ |
| 0,112 |                | 0,0346 |  |
| 0,109 |                | 0,0338 |  |
| 0,100 |                | 0,0310 |  |
|       |                |        |  |

**Аналитик 2.**

| A      | A <sub>0</sub> | X, %   | Метрологическая характеристика  |
|--------|----------------|--------|---|
| 0,102  | 0,480          | 0,0320 | $X_{\text{средн}} = 0,0329$<br>$S = 0,00138$<br>$S_{x \text{ средн}} = 0,000617$<br>$\Delta X = 0,0038$<br>$\Delta X_{\text{средн}} = 0,0017$<br>$\varepsilon = \pm 11,70\%$<br>$\varepsilon_{\text{средн}} = \pm 5,21\%$ |
| 0,110  |                | 0,0345 |   |
| 0,107  |                | 0,0335 |   |
| 0,0992 |                | 0,0310 |   |
| 0,107  |                | 0,0335 |   |

Методика определения примеси 3-АПР в субстанции КОН-1 высокочувствительна; позволяет определять до 0,02% примеси.

Методика апробирована на 3 сериях субстанции КОН-1. Полученные результаты, %:  $0,035 \pm 0,002$ ;  $0,030 \pm 0,002$ ;  $0,023 \pm 0,003$ . Рекомендуется нормировать содержание примеси в КОН-1 не более 0,05% (оптическая плотность испытуемого раствора не более 0,15). Методика включена в ФСП на субстанцию КОН-1.



## **5.2. Разработка методики определения примесей МЭАПВК и ББА в субстанции КОН-1 методом обращённо-фазной ВЭЖХ**

### **5.2.1. Выбор условий хроматографического разделения посторонних примесей в субстанции КОН-1**

На этапе выбора оптимального состава подвижной фазы апробированы элюенты на основе ацетонитрила и воды с добавлением различных модификаторов (неорганических солей, кислот и оснований).

Для изучения разделения определяемых компонентов (КОН-1, МЭАПВК и 4-ББА) нами исследованы следующие элюенты:

- ацетонитрил – вода (рН 5,8);
- ацетонитрил – 0,05 % раствор трифторуксусной кислоты (рН 3);
- ацетонитрил – фосфатный буфер (рН 7).

Использование элюентов со значением рН выше 7 неприемлемо при анализе на данном виде сорбента (модифицированном фазой С18 силикагеле) по причине растворения силикатной основы [101, 112].

Регистрация определяемых компонентов осуществлялась с помощью спектрофотометрического детектирования (диодная матрица), поскольку данные вещества в своей структуре содержат хромофорные группы, обуславливающие поглощение в УФ-области спектра. В режиме обзорного хроматографирования нами сняты УФ-спектры анализируемых веществ в используемых подвижных фазах (рис. 5.4 – 5.9).

Анализ полученных спектров показал, что состав подвижной фазы и реакция среды оказывают значительное влияние на характер поглощения исследуемых веществ. КОН-1 при использовании элюента ацетонитрил – раствор трифторуксусной кислоты (рН 3) имеет два максимума поглощения при 230 и 252 нм (рис. 5.4). В элюентах ацетонитрил – вода (рН 5,8) и

ацетонитрил – фосфатный буфер (рН 7) [29] появляется хорошо выраженный пик при 324 нм (рис 5.5).

Для спектров МЭАПВК при переходе из кислой среды (рН 3) в слабокислую (рН 5,8) и нейтральную (рН 7) наблюдается батохромный сдвиг – максимум поглощения смещается от 284 нм до 306 нм и 310 нм соответственно (рис. 5.6 5.7 5.8). 4-ББА во всех используемых элюентах имеет максимум поглощения при 260 нм (рис. 5.9).

При анализе полученных спектров выбраны аналитические длины волн детектирования возможных примесей в КОН-1:

- МЭАПВК: 284 нм при использовании элюента ацетонитрил - 0,05 % раствор трифторуксусной кислоты (рН 3);
- 306 нм – ацетонитрил – вода (рН 5,8);
- 310 нм – ацетонитрил - фосфатный буфер (рН 7).
- 4-ББА: 260 нм (во всех используемых подвижных фазах).



Рисунок 5.4 - УФ-спектр КОН-1 в элюенте ацетонитрил – раствор трифторуксусной кислоты (рН 3)

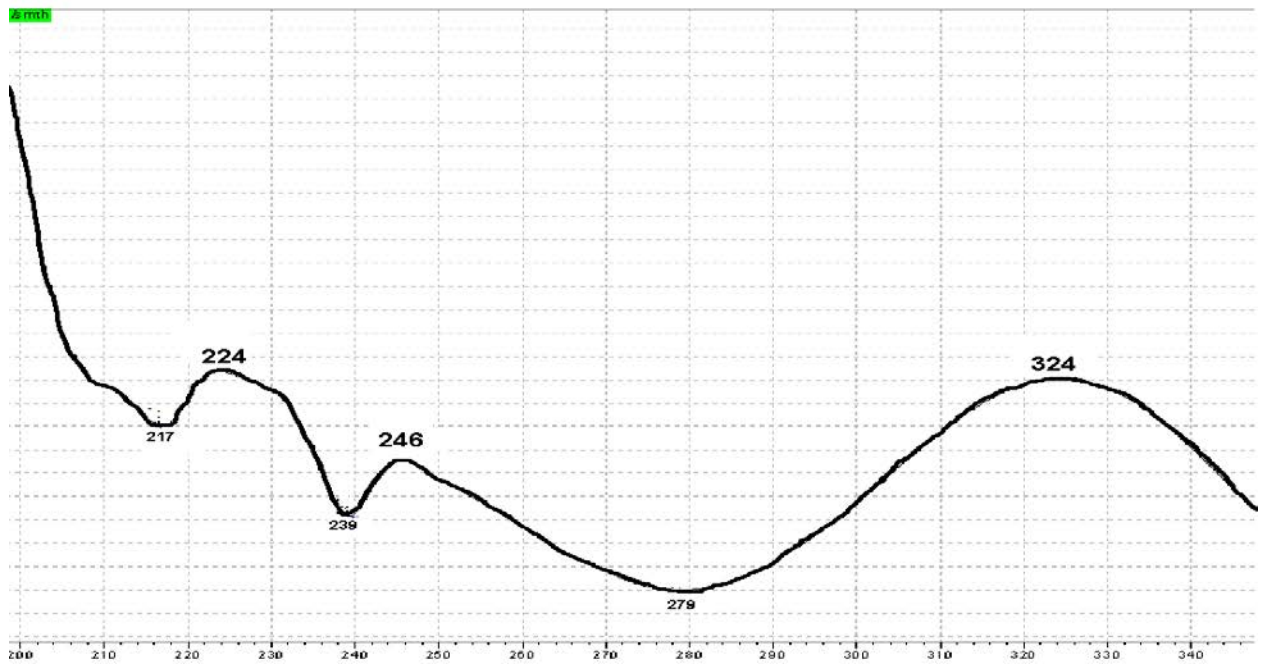


Рисунок 5.5 - УФ-спектр КОН-1 в элюенте ацетонитрил – вода (pH 5,8), ацетонитрил – фосфатный буфер (pH 7)

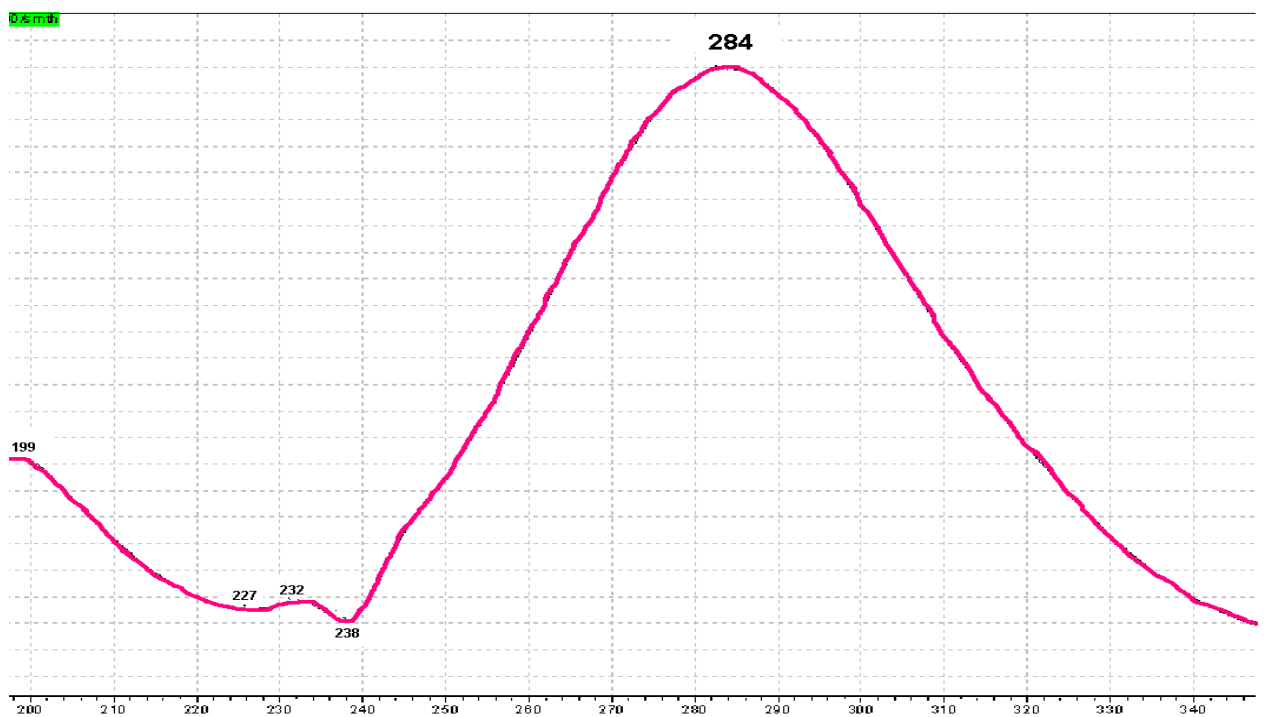


Рисунок 5.6 - УФ-спектр МЭАПВК в элюенте ацетонитрил – раствор трифторуксусной кислоты (pH 3)

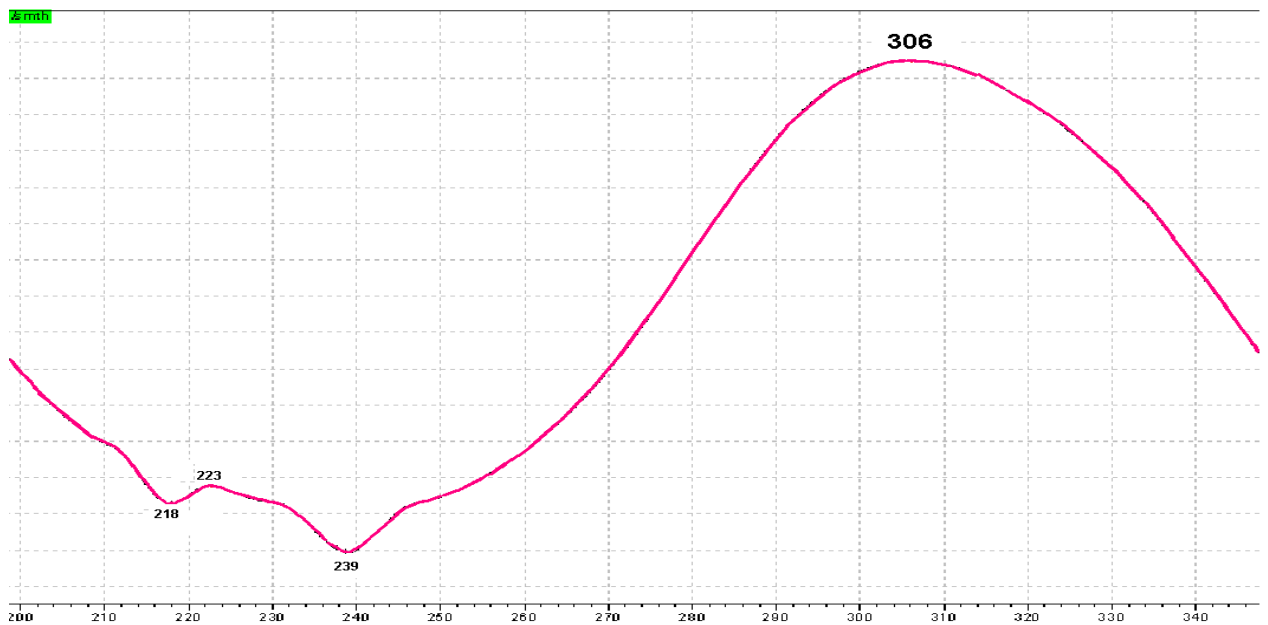


Рисунок 5.7 - УФ-спектр МЭАПВК в элюенте ацетонитрил – вода (pH 5,8)

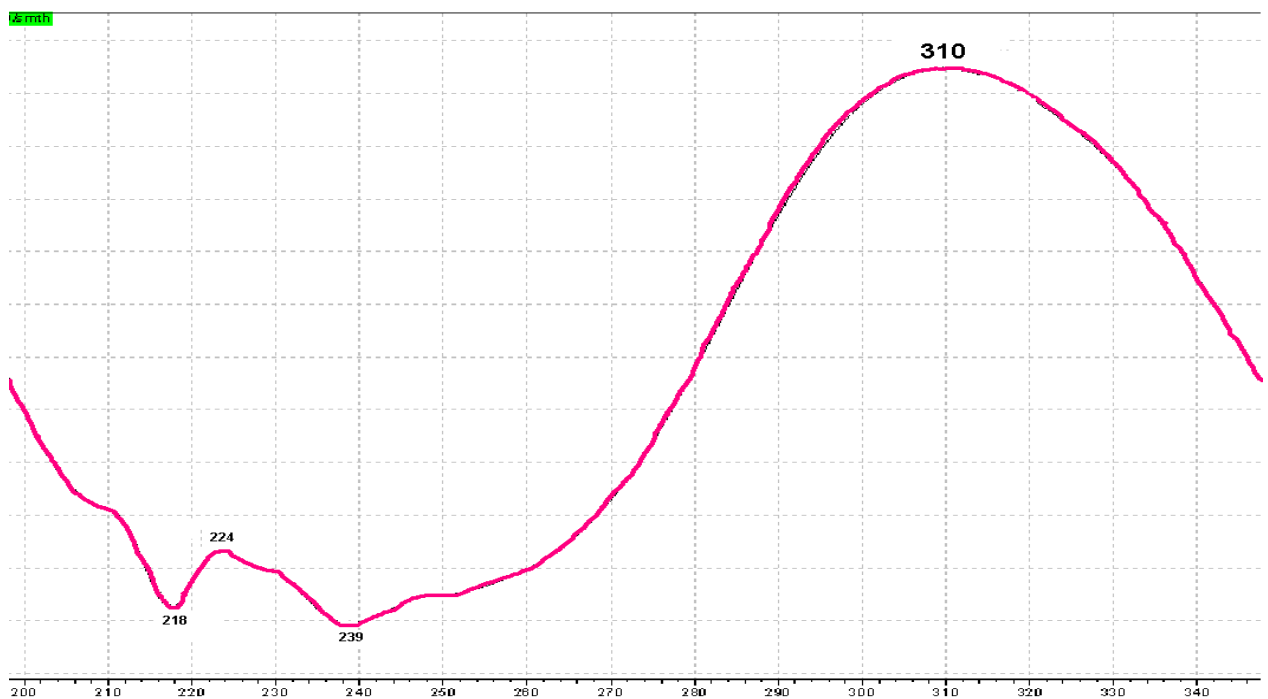


Рисунок 5.8 - УФ-спектр МЭАПВК в элюенте ацетонитрил – фосфатный буфер (pH 7)

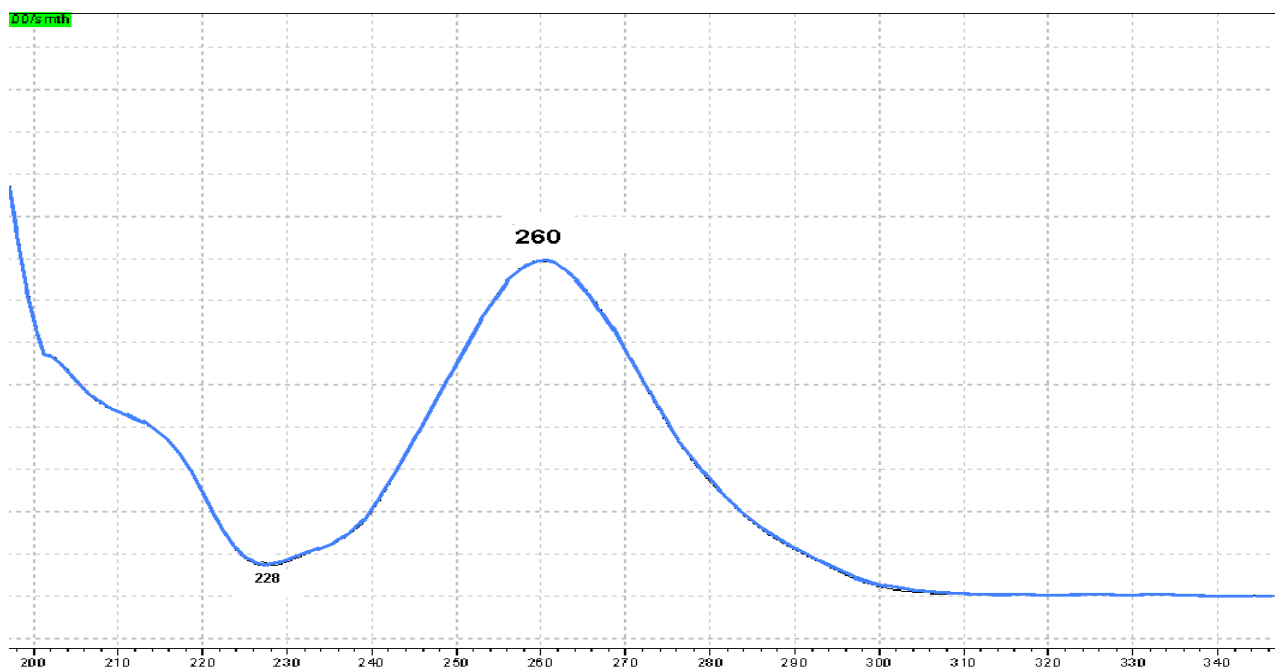


Рисунок 5.9 - УФ-спектр 4-ББА (во всех используемых элюентах)

Проведенные исследования по выбору условий хроматографического определения показали, что элюенты на основе воды и трифторуксусной кислоты не обеспечивают удовлетворительного разделения основного вещества (КОН-1) от примеси МЭАПВК. Значение коэффициента разделения ( $R_s$ ) не превышало 1,2. Кроме того, хроматографические пики данных веществ имели асимметричную уширенную форму.

При использовании элюента на основе фосфатного буфера наблюдалось хорошее разделение всех определяемых веществ, а также улучшение форм хроматографических пиков. В данных условиях определяемые вещества элюировались в следующем порядке: МЭАПВК, КОН-1, 4-ББА. Приемлемое значение коэффициента емкости (2,11) у МЭАПВК наблюдалось только при использовании элюента с содержанием органического компонента (ацетонитрила) не более 20%, что свидетельствует о плохом удерживании вещества в обращённо-фазном режиме ВЭЖХ.

Однако при анализе смеси на элюенте ацетонитрил – фосфатный буфер (рН 7) в соотношении 20:80 в изократическом режиме время удерживания 4-ББА превышало 30 мин. Для оптимизации методики в плане экспрессности нами был применен градиентный режим элюирования, который позволил сократить время анализа до 20 мин.

В результате проведенных исследований для определения посторонних примесей в субстанции КОН-1 были выбраны следующие хроматографические условия:

- хроматографическая колонка из нержавеющей стали (25см × 4,6мм), заполненная обращённо-фазным сорбентом Discovery® C18 5 мкм);
- объем вводимой пробы – 20 мкл;
- температура термостата колонки – 40 °С;
- подвижная фаза: фосфатный буфер (рН 7) – ацетонитрил;
- режим элюирования – градиентный (исходная доля ацетонитрила в элюенте – 20% в течение 10 мин, с 10 по 20 мин возрастание доли ацетонитрила до 80%);
- скорость потока подвижной фазы – 1,5 мл/мин.
- длина волны детектирования – 310 нм (для МЭАПВК), 260 нм (для 4-ББА) [22].

### **5.2.2. Валидация разработанной методики**

На основании проведенных исследований предложена методика определения посторонних (специфических) примесей в субстанции КОН-1.

Методика. 0,050 г субстанции КОН-1 помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 15 мл метанола, доводят объем колбы метанолом до метки и перемешивают. Концентрация субстанции КОН -1 в анализируемом растворе составляет 0,002 г/мл (2000 мкг/мл). Раствор хроматографируют не менее 3 раз.

Валидацию аналитической методики проводили по параметрам: специфичность, линейность, предел обнаружения и предел количественного определения, повторяемость (сходимость), правильность.

### *Специфичность*

Для подтверждения специфичности методики проанализированы модельная смесь КОН-1 (2 мг/мл), МЭАПВК и 4-ББА (по 10 мкг/мл) в метаноле и растворитель образца (метанол). Идентификацию веществ на хроматограмме осуществляли путем сопоставления времён удерживания аналитов и стандартных образцов.

На хроматограммах модельной смеси КОН-1 и возможных примесей, снятых при 260 и 310 нм (рис. 5.10–5.11) наблюдается четкое разделение пиков анализируемых веществ. Времена удерживания КОН-1, МЭАПВК и 4-ББА составили  $2,40 \pm 0,02$  мин;  $5,45 \pm 0,02$  мин;  $18,78 \pm 0,03$  мин соответственно. На хроматограммах растворителя (рис. 5.12 и 5.13) отсутствуют посторонние пики, мешающие определению анализируемых соединений, т.е. имеющие близкие времена удерживания.

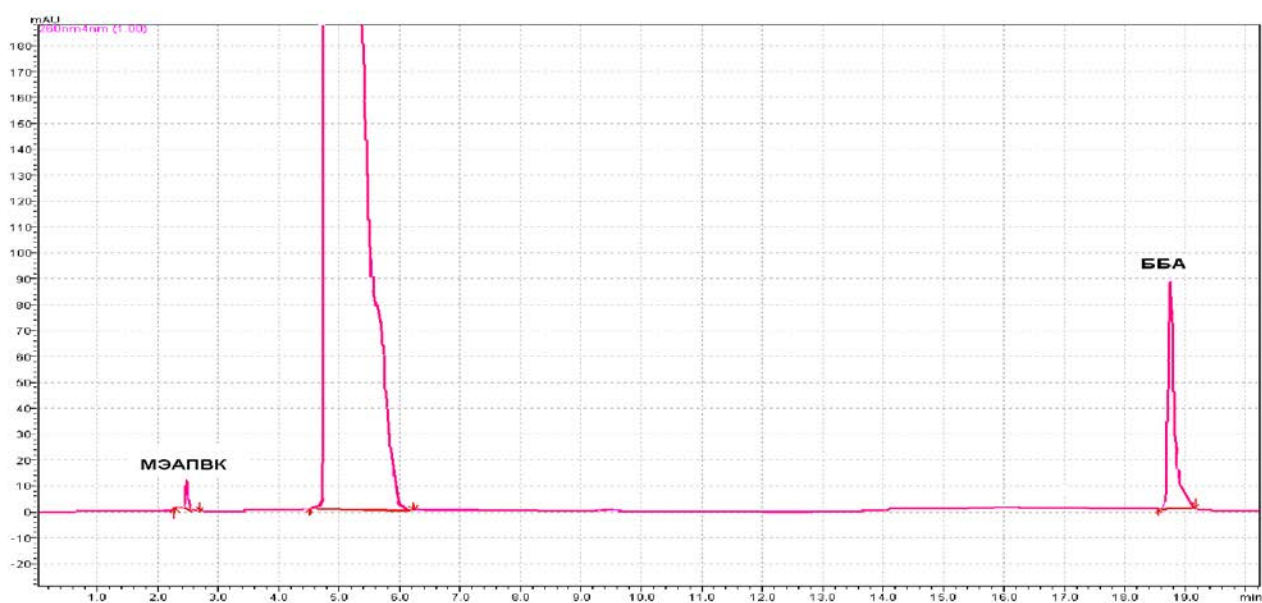


Рисунок 5.10 - Хроматограмма модельной смеси КОН-1 и примесей в метаноле (длина волны детектирования – 260 нм)

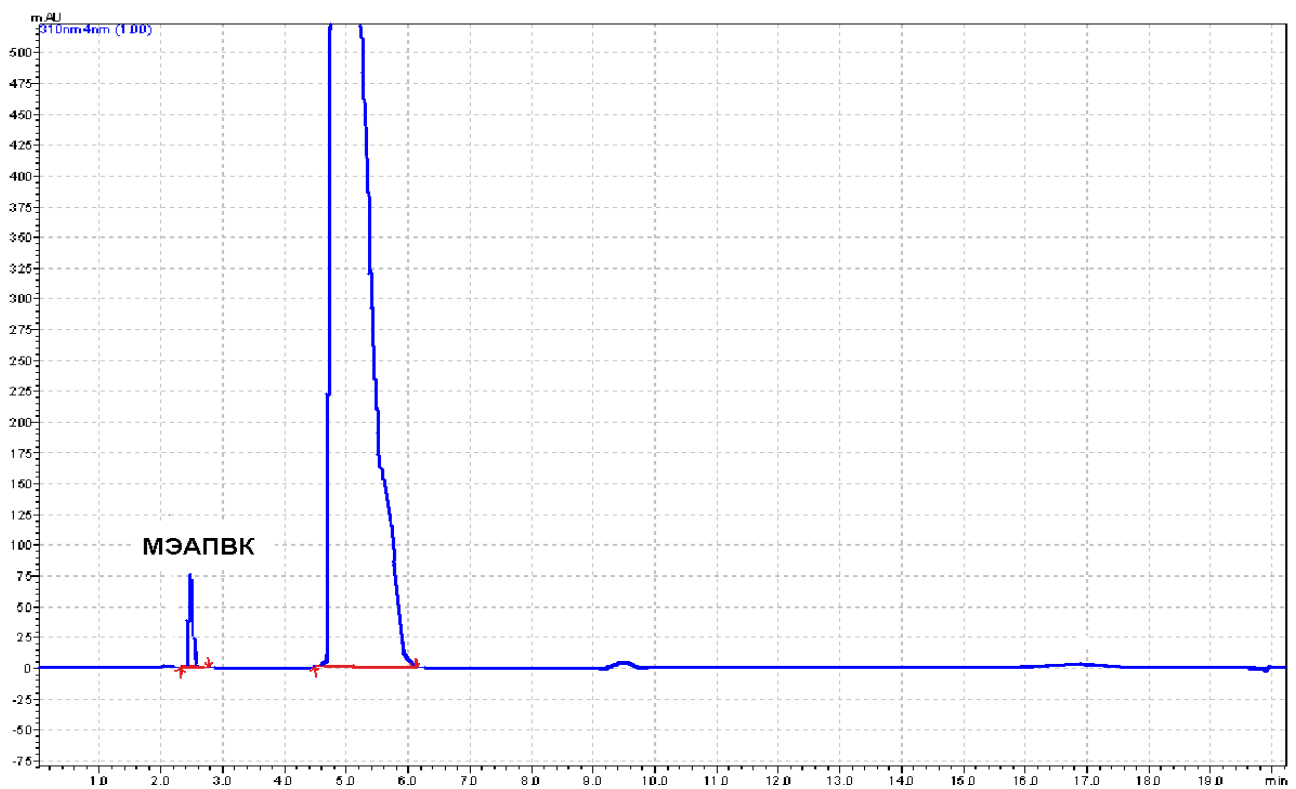


Рисунок 5.11 - Хроматограмма модельной смеси КОН-1 и примесей в метаноле (длина волны детектирования – 310 нм)

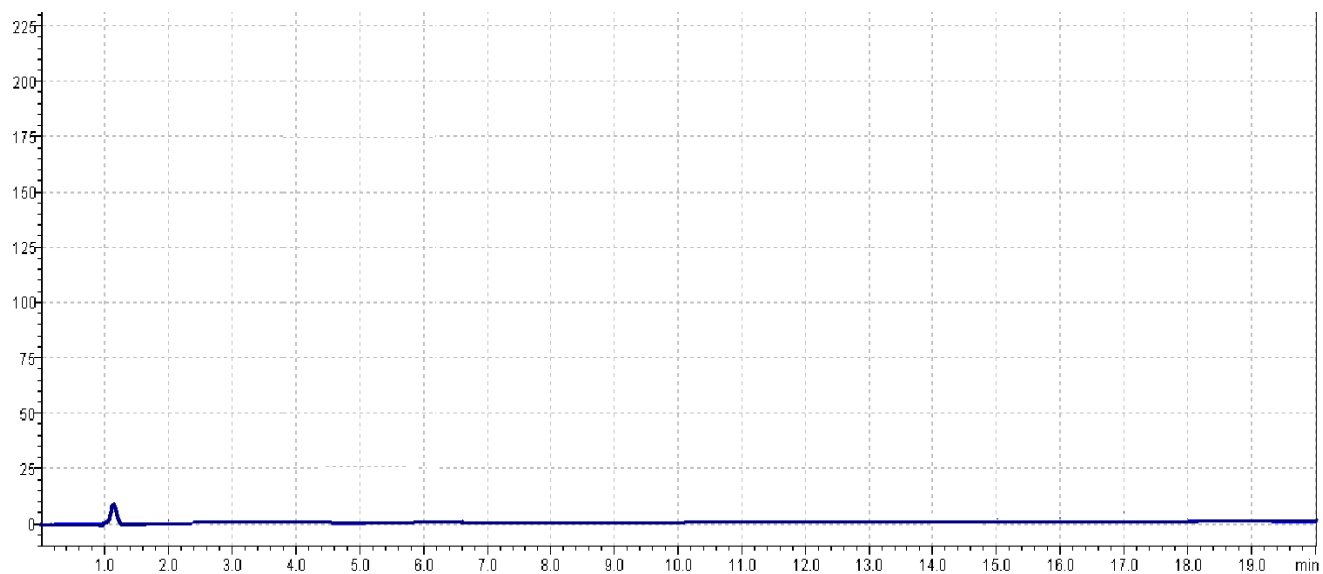


Рисунок 5.12 - Хроматограмма растворителя образца (длина волны детектирования 260 нм)



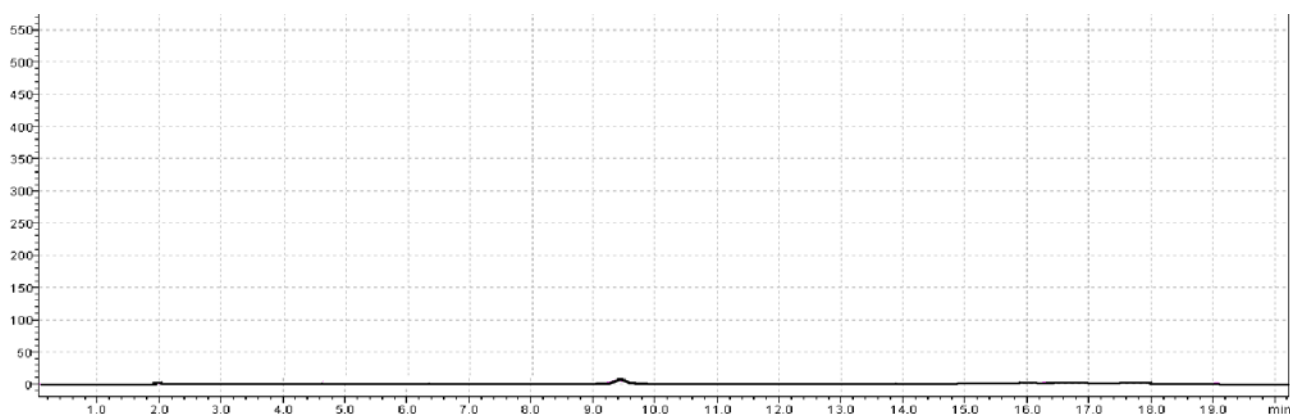


Рисунок 5.13 - Хроматограмма растворителя образца (длина волны детектирования 310 нм)

При анализе модельной смеси оценены параметры, характеризующие пригодность хроматографической системы: коэффициент разделения ( $R_s$ ), эффективность колонки, коэффициент асимметрии пиков, критерий воспроизводимости результатов измерений (воспроизводимости инъекций) (табл.1 5.7). Полученные данные свидетельствуют о приемлемом разрешении и воспроизводимости хроматографической системы.

Таблица 5.7 - Параметры пригодности хроматографической системы

| Вещество | Время удерживания, мин* | Коэффициент разделения пиков $R_s$          | Коэффициент асимметрии                     | Эффективность колонки (N)                   | RSD % площади пика*                         |
|----------|-------------------------|---|--|---|---|
| МЭАПВК   | 2,40 ± 0,02             |   | 1,21                                       | 4020 тт                                     | 0,55  |
| КОН-1    | 5,45 ± 0,02             | 6   |  |   |   |
| 4-ББА    | 18,78 ± 0,03            | 17  | 1,35                                       | 8900 тт                                     | 0,32  |
|          |                         | <i>Критерий приемлемости:</i><br>не менее 2 | <i>Критерий приемлемости:</i><br>0,8 – 1,5 | <i>Критерий приемлемости:</i><br>более 2000 | <i>Критерий приемлемости:</i><br>не более 2 |

\*- расчет проводился по 5 хроматограммам раствора

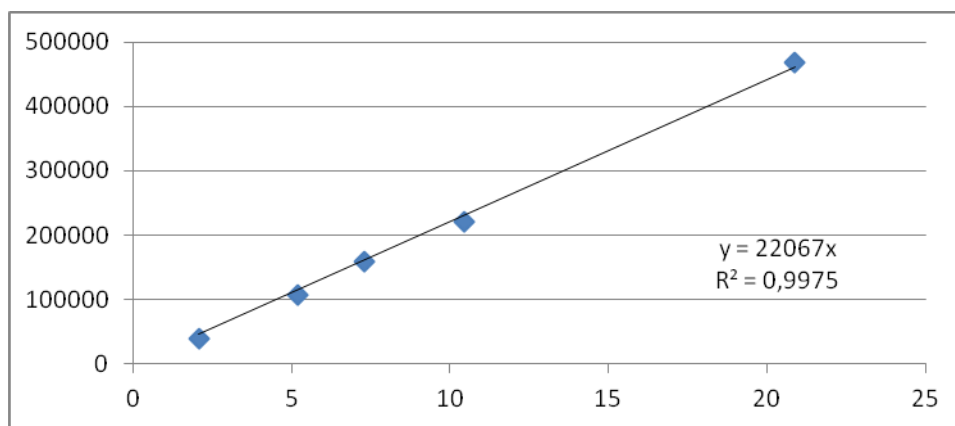
### *Линейность*

**Линейность** методики определяли на пяти или шести уровнях концентраций: для МЭАПВК - 0,1; 0,25; 0,35; 0,5; 1% от содержания в основном веществе – субстанции КОН-1; для ББА – 0,05; 0,1; 0,25; 0,35; 0,5; 1% от содержания в основном веществе. Для этого в мерные колбы вместимостью 25 мл помещали раствор МЭАПВК или ББА в метаноле с точной концентрацией около 50 мкг/мл (0,5, 1,0, 2,5, 3,5, 5,0 и 10,0 мл) и доводили объем колб метанолом до метки.

Каждый из полученных растворов хроматографировали в разработанных условиях не менее 3 раз. Рассчитывали среднее значение площадей пиков и строили кривую зависимости площади пика от концентрации вещества в растворе (табл. 5.8 , рис. 5.14, 5.15).

**Таблица 5.8 - Данные для построения калибровочных графиков  
МЭАПВК и 4-ББА**

| Концентрация МЭАПВК, мкг/мл | Площадь хроматографического пика | Концентрация 4-ББА, мкг/мл | Площадь хроматографического пика |
|-----------------------------|----------------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| -                           | -                                | 1,03                       | 81737                            |
| 2,09                        | 39540                            | 2,06                       | 160962                           |
| 5,22                        | 106792                           | 5,16                       | 438139                           |
| 7,31                        | 159601                           | 7,22                       | 565983                           |
| 10,44                       | 220885                           | 10,32                      | 854263                           |
| 20,88                       | 468876                           | 20,64                      | 1620573                          |



Рисинок 5.14 - Калибровочный график количественного определения МЭАПВК

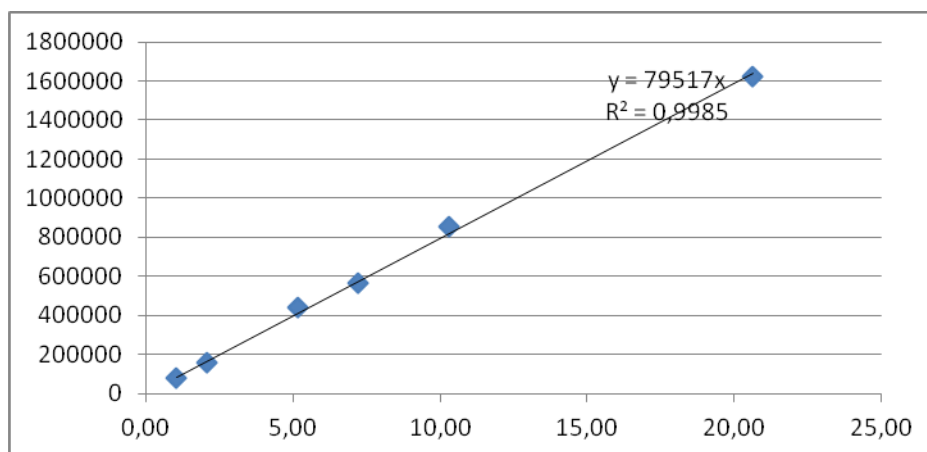


Рисунок 5.15 - Калибровочный график количественного определения 4-ББА

Предел обнаружения МЭАПВК – 0,8 мкг/мл (0,04% от содержания в субстанции КОН-1); предел количественного определения – 1,5 мкг/мл (0,075% от содержания в субстанции КОН-1).

Предел обнаружения 4-ББА – 0,3 мкг/мл (0,015% от содержания в субстанции КОН-1); предел количественного определения – 0,5 мкг/мл (0,025% от содержания в субстанции КОН-1).

#### *Повторяемость (сходимость) результатов*

Оценку внутрилабораторной повторяемости разработанной методики проводили на модельных растворах. Для этого 0,050 г субстанции КОН-1

помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляли растворы МЭАПВК и 4-ББА в метаноле с концентрацией 50 мкг/мл до получения концентраций, соответствующих 0,1%; 0,25%, 0,5% и 0,75% от содержания основного вещества, и доводили объем колб метанолом до метки. Каждый из растворов хроматографировался не менее 3 раз (табл. 5.9, 5.10).

Относительное стандартное отклонение (RSD) не превышает 10,0%, что свидетельствует об удовлетворительной сходимости результатов на всех уровнях рассматриваемых концентраций для обоих веществ.

**Таблица 5.9 – Оценка повторяемости методики определения МЭАПВК**

| Содержание МЭАПВК в модельной смеси, мкг/мл | Определено содержание МЭАПВК, мкг/мл        | Метрологические характеристики (P =0,95; n=6) |       |       |      |      |
|---|---|---|-------|-------|------|------|
|   |   | n   | Хср.  | SD    | RSD  | ΔX   |
| 2   | 1,66; 1,87; 1,78;<br>2,04; 1,63; 1,91       | 6   | 1,82  | 0,150 | 8,29 | 0,16 |
| 5   | 4,52; 5,11; 4,24;<br>4,72; 5,08; 4,50       | 6   | 4,70  | 0,334 | 7,12 | 0,36 |
| 10  | 10,12; 8,76; 9,78;<br>10,07; 8,88; 9,62     | 6   | 9,54  | 0,586 | 6,15 | 0,61 |
| 15  | 14,52; 15,06; 13,98;<br>14,83; 15,21; 14,56 | 6   | 14,69 | 0,44  | 2,98 | 0,44 |

**Таблица 5.10 – Оценка повторяемости методики определения 4-ББА**

| Содержание 4-ББА в модельной смеси, мкг/мл | Определено содержание ББА, мкг/мл           | Метрологические характеристики (P =0,95; n=6) |       |       |      |      |
|--|---|---|-------|-------|------|------|
|  |   | n   | Хср.  | SD    | RSD  | ΔX   |
| 2  | 1,58; 1,65; 1,84;<br>1,49; 1,88; 1,61       | 6   | 1,68  | 0,123 | 7,33 | 0,16 |
| 5  | 5,36; 4,72; 5,19;<br>4,92; 5,21; 5,09       | 6   | 5,08  | 0,223 | 4,51 | 0,24 |
| 10   | 9,74; 10,40; 10,18;<br>9,92; 9,67; 10,22    | 6   | 10,02 | 0,276 | 2,76 | 0,30 |
| 15   | 14,30; 15,27; 14,10;<br>14,82; 15,15; 15,38 | 6   | 14,84 | 0,472 | 3,19 | 0,56 |

### *Правильность*

При определении правильности методики оценивали открываемость известного количества посторонних примесей, введенных в плацебо (субстанцию КОН-1). Исследования проведены на трех уровнях содержания примесей (0,1%, 0,5% и 0,75%). По 0,05 г субстанции КОН-1 помещали в мерные колбы вместимостью 25 мл, растворяли в 10 мл метанола, добавляли в каждую колбу раствор МЭАПВК и 4-ББА в метаноле с концентрацией 50 мкг/мл (1,0; 5,0 и 7,5 мл) и доводили объем колб метанолом до метки. Результаты представлены в таблицах 5.11 и 5.12.

**Таблица 5.11 – Оценка правильности методики определения МЭАПВК**

| Содержание МЭАПВК в модельной смеси, мкг/мл | Открываемость (R), %                    | Метрологические характеристики (P =0,95; n=6) |       |      |      |      |
|---|---|---|-------|------|------|------|
|   |   | n   | R ср. | SD   | RSD  | ΔR   |
| 2   | 79,2; 82,5; 88,6;<br>77,2; 101,5; 86,2  | 6   | 89,2  | 8,47 | 9,50 | 9,00 |
| 10  | 100,1; 87,4; 94,2;<br>103,6; 89,1; 97,8 | 6   | 95,4  | 6,23 | 6,54 | 6,64 |
| 15  | 102,1; 98,9; 100,5;<br>97,3; 99,1; 97,8 | 6   | 98,8  | 2,61 | 2,65 | 2,78 |

**Таблица 5.12 – Оценка правильности методики определения 4-ББА**

| Содержание 4-ББА в модельной смеси, мкг/мл | Открываемость (R), %                    | Метрологические характеристики (P =0,95; n=6) |       |      |      |      |
|--|---|---|-------|------|------|------|
|  |   | n   | R ср. | SD   | RSD  | ΔR   |
| 2  | 99,7; 105,1; 93,4;<br>97,1; 102,7; 90,9 | 6   | 98,15 | 4,36 | 4,44 | 5,70 |
| 10   | 102,5; 95,6; 100,8;<br>95,2; 92,0; 98,1 | 6   | 97,37 | 3,87 | 3,97 | 4,07 |
| 15   | 96,2; 102,8; 100,3;<br>92,8; 98,4; 94,3 | 6   | 97,47 | 3,48 | 3,58 | 3,94 |

Границы открываемости МЭАПВК и ББА не выходят за пределы 75–125%, рекомендованные при количественном определении примесей с нормой содержания от 0,1 до 1%.

Анализ пяти серий субстанции КОН-1 показал, что содержание в них посторонних примесей МЭАПВК и 4-ББА не превышает 0,1%.

Разработанная методика включена в проект ФСП на субстанцию КОН-1.

## ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5

1. Спектры поглощения продукта реакции 3-АПР - нингидрин, полученного при различных значениях рН в интервале от 6,0 до 7,4, характеризуются двумя четко выраженными максимумами поглощения при длине волны  $400 \pm 2$  нм и  $568 \pm 2$  нм, положение которых не зависит от рН буферного раствора. Реакция среды существенно влияет на интенсивность поглощения, максимальная оптическая плотность у 3-АПР достигается при рН 6,8.

2. Введение аскорбиновой кислоты в реакционную массу не изменяет характера спектра поглощения продукта реакции 3-АПР – нингидрин, но значительно увеличивает интенсивность светопоглощения, придаёт зависимости оптической плотности от концентрации линейный характер. Область линейности графика составляет 0,75-4,50 мкг/мл. Предел обнаружения для 3-АПР составляет 0,155 мкг/мл.

3. Разработана методика определения примеси 3-аминопропанола в субстанции КОН-1, относительная ошибка среднего результата не превышает  $\pm 5,50\%$ . Методом дифференциальной спектрофотометрии (методом добавок) доказана её избирательность.

4. Изучен характер спектров поглощения КОН-1, метилового эфира ацетилпировиноградной кислоты и 4-бромбензальдегида в подвижных фазах с различными значениями рН. Выбраны аналитические длины волн детектирования возможных примесей в КОН-1: МЭАПВК: 284 нм при использовании элюента ацетонитрил - 0,05 % раствор трифторуксусной кислоты (рН 3); 306 нм – ацетонитрил – вода (рН 5,8); 310 нм – ацетонитрил - фосфатный буфер (рН 7); 4-ББА: 260 нм (во всех используемых подвижных фазах).

5. Исследовано хроматографическое поведение возможных примесей в субстанции КОН-1. Оптимальные условия анализа: обращённо-фазный вариант ВЭЖХ; температура термостата колонки – 40 °С; подвижная фаза:

фосфатный буфер (рН 7) – ацетонитрил; режим элюирования – градиентный; длина волны детектирования – 310 нм (для МЭАПВК), 260 нм (для 4-ББА).

6. Валидация разработанной методики по параметрам специфичность, линейность, предел обнаружения и предел количественного определения, повторяемость (сходимость), правильность показала её приемлемость для определения 0,05-0,75% примесей МЭАПВК и 4-ББА в субстанции КОН-1.



## **ГЛАВА 6. ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ СУБСТАНЦИИ КОН-1 ПРИ ХРАНЕНИИ В ЕСТЕСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ**

Изучение стабильности и времени, в течение которого ЛС полностью сохраняет свою безвредность, терапевтическую активность и удовлетворяет всем требованиям нормативной документации, является необходимым в связи с высокими требованиями к их качеству и срокам годности. В связи с этим проведены исследования по определению устойчивости и установлению сроков годности субстанции КОН-1.

Изучение стабильности БАВ проводили в естественных условиях; образцы опытных серий субстанции КОН-1 (серии 241109, 061209, 100210, 150410, 261010) хранили в сухом защищенном от света месте при комнатной температуре в банках оранжевого стекла с винтовой горловиной типа БВ-1000-28 по ОСТ 64-2-71-80 с навинчивающимися пластмассовыми крышками по ОСТ 64-2-87-81.

Контроль качества изучаемых образцов проводили по основным показателям, которые определяли через промежутки времени, соответствующие году хранения, по показателям представленным в таблице 6.1.

Проведенные исследования (табл. 6.2) позволили сделать вывод о стабильности КОН-1 в течение не менее 3 лет. Таким образом, предварительно установлен 3-х летний срок годности субстанции нового БАВ.

Изучение стабильности субстанции КОН-1 при хранении в естественных условиях продолжаются.

**Таблица 6.1 - Нормы качества субстанции КОН-1, контролируемые при хранении в естественных условиях**

| Показатели                        | Методы   | Нормы  |
|-----------------------------------|--|--|
| <b>Описание</b>                   | Органолептический. ГФ XII, ч.1, с. 17, 484               | Белый мелкокристаллический порошок, без запаха   |
| <b>Подлинность</b>                | Инфракрасная спектроскопия                               | Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области от 4000 до 400 см <sup>-1</sup> по положению полос поглощения должен соответствовать рисунку спектра КОН-1. |
|                                   | Ультрафиолетовая спектрофото-метрия                      | Ультрафиолетовый спектр поглощения 0,001% раствора субстанции в области от 220 до 350 нм должен иметь максимум при 328 ± 1 нм.   |
|                                   | Качественная реакция с 3% раствором железа(III) хлорида  | Появление красного окрашивания.  |
|                                   | Качественная реакция с кислотой серной концентрированной | Появление красного окрашивания.  |
| <b>Температура плавления</b>      | ГФ XII, ч.1, с. 29, метод 1                              | От 212 до 214 °С   |
| <b>Посторонние примеси</b>        | ВЭЖХ   | Любая единичная неидентифицированная примесь - не более 0,25%; сумма примесей - не более 0,5%.   |
| <b>3-Аминопропанол</b>            | Спектрофотометрия  | Не более 0,05%   |
| <b>Микробиологическая чистота</b> | ГФ XII, ч. 1, с. 160                                     | Категория 2.2  |
| <b>Количественное определение</b> | Алкалиметрический метод                                  | Не менее 99,0% C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>4</sub> Br в пересчете на сухое вещество  |

Таблица 6.2 - Результаты эксперимента по изучению стабильности субстанции КОН-1 в естественных условиях

| Серия                    | Срок хранения, год | Описание                                       | Подлинность  |                             |  |   | Температура плавления, °С | Посторонние примеси, %                                       | 3-Аминопропанол, % | Микробиологическая чистота | Количественное определение, %                                     |
|--------------------------|--------------------|--|--|-----------------------------|--|---|---------------------------|--|--------------------|----------------------------|---|
|                          |                    |  | ИК-спектр  | УФ-спектр                   | Реакция с 3% раствором железа(III) хлорида | Реакция с кислотой серной концентрированной |                           |  |                    |                            |   |
| 1                        | 2                  | 3  | 4  | 5                           | 6  | 7   | 8                         | 9  | 10                 | 11                         | 12  |
| Нормы ФСП                |                    |  |  |                             |  |   |                           |  |                    |                            |   |
|                          |                    | Белый мелкокристаллический порошок, без запаха | Соответствие рисунку спектра по положению полос поглощения | Максимум при $328 \pm 1$ нм | Появление красного окрашивания             | Появление красного окрашивания              | От 212 до 214 °С          | Любая примесь - не более 0,25; сумма примесей - не более 0,5 | Не более 0,05      | Категория 2.2              | Не менее 99,0% $C_{15}H_{16}NO_4Br$ в пересчете на сухое вещество |
| Экспериментальные данные |                    |  |  |                             |  |   |                           |  |                    |                            |   |
| 241109                   | 0                  | Белый мелкокристаллический порошок, без запаха | Соответствие рисунку спектра по положению полос поглощения | Максимум при 328 нм         | Появление красного окрашивания             | Появление красного окрашивания              | 213 - 214                 | Не определяли*   | Не определяли*     | Не определяли*             | $99,87 \pm 0,20$  |
|                          | 1                  | - // -   | - // -   | - // -                      | - // -                                     | - // -                                      | - // -                    | Соответствует  | Соответствует      | Соответствует              | $99,83 \pm 0,29$  |



|        | 2 | 3  | 4  | 5                   | 6                              | 7                              | 8         | 9               | 10             | 11             | 12          |
|--------|---|--|--|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------|-----------------|----------------|----------------|-------------|
|        | 3 | - // -   | - // -   | - // -              | - // -                         |                                | - // -    | - // -          | - // -         | - // -         | 99,69± 0,24 |
| 261010 | 0 | Белый мелкокристаллический порошок, без запаха | Соответствие рисунку спектра по положению полос поглощения | Максимум при 328 нм | Появление красного окрашивания | Появление красного окрашивания | 212 - 213 | Не определяли*  | Не определяли* | Не определяли* | 99,85± 0,29 |
|        | 1 | - // -   | - // -   | - // -              | - // -                         | - // -                         | - // -    | Соответствует . | Соответствует  | Соответствует  | 99,75± 0,40 |
|        | 2 | - // -   | - // -   | - // -              | - // -                         | - // -                         | - // -    | - // -          | - // -         | - // -         | 99,70± 0,38 |
|        | 3 | - // -   | - // -   | - // -              | - // -                         | - // -                         | - // -    | - // -          | - // -         | - // -         | 99,65± 0,28 |

\*Примечание. Анализ по разделам «Посторонние примеси», «3-Аминопропанол» и «Микробиологическая чистота» не проводился в связи с отсутствием методик.

## **ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 6**

1. Изучена стабильность КОН-1 в условиях естественного хранения при температуре 20 °С в сухом, защищенном от света месте (период наблюдения три года).
2. Установлен 3-х летний срок годности субстанции нового БАВ.

## ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. В результате химико-фармацевтических исследований субстанции КОН-1 (4-ацетил-5-(4-бромфенил)-3-гидрокси-1-(3-гидроксипропил)-3-пирролин-2-он) нормированы показатели, характеризующие её подлинность и доброкачественность: описание, растворимость, температура плавления, кислотность и щелочность раствора; потеря в массе при высушивании, сульфатная зола, предельное содержание хлоридов и сульфатов, микробиологическая чистота. Для идентификации КОН-1 использованы реакции подлинности, обусловленные свойствами енольного гидроксила и бензольного радикала в его структуре. В проект ФСП на субстанцию КОН-1 включены реакции с раствором железа(III) хлорида (общегрупповая реакция) и серной кислотой концентрированной (избирательная реакция), предел обнаружения составил соответственно 0,05 и 0,1 мг.

2. Исследованы спектральные характеристики КОН-1 в УФ- и ИК-областях. Рекомендовано приоритетное установление подлинности субстанции соединения по ИК-спектру. Рассчитанные оптические параметры электронных спектров (удельный и молярный показатели поглощения; полуширина полосы поглощения; фактор асимметрии; интегральная интенсивность полосы поглощения; сила осциллятора; момент электронного перехода), имеющие индивидуальные значения, позволяют их использовать для дополнительной идентификации КОН-1 (для отличия от аналогичных производных 3-пирролин-2-она). Показана возможность использования метода  $^1\text{H}$  ЯМР для отличия от близких по химической структуре веществ.

3. Рассчитанные по результатам потенциометрического титрования КОН-1 значения  $pK_a$  в водно-спиртовом и водно-диметилформамидном растворах составили  $3,21 \pm 0,03$  и  $4,85 \pm 0,07$  соответственно, что свидетельствует о достаточно сильных кислотных свойствах КОН-1. На кривых титрования КОН-1 наблюдался один скачок в области pH 6,5-9,4. Разработана методика алкалиметрического определения субстанции КОН-1

(в среде спирта 96%, индикатор – фенолфталеин). Пригодность методики доказана её валидацией по показателям: линейность результатов, правильность и сходимость в аналитической области. Относительная ошибка среднего результата не превышает  $\pm 0,20\%$ . Методика включена в проект ФСП на субстанцию КОН-1.

4. Разработаны и валидированы спектрофотометрические методики количественного определения КОН-1 в УФ- и видимой области (на основе реакции с железа (III) хлоридом). Графики зависимости оптической плотности от концентрации раствора КОН-1 имеют линейный характер в области 2 – 20 мкг/мл и 0,02 – 0,2 мг/мл соответственно. Исследования, проведенные на трех уровнях концентрации КОН-1, свидетельствует о точности методик. Методики избирательны и могут быть использованы для количественного определения соединения КОН-1 в составе гранулята, содержащего лактозу и ПВП.

5. Разработана спектрофотометрическая методика определения примеси 3-АПР в субстанции КОН-1 (на основе реакции с нингидрином). Предел обнаружения примеси составляет 0,155 мкг/мл; относительная ошибка среднего результата не превышает  $\pm 5,50\%$ . Для определения примесей МЭАПВК и 4-ББА в субстанции КОН-1 предложен метод ВЭЖХ (обращённо-фазный вариант). Валидация разработанной методики по параметрам специфичность, линейность, предел обнаружения и предел количественного определения, повторяемость, правильность показала её приемлемость для определения 0,05-0,75% примесей МЭАПВК и 4-ББА в субстанции КОН-1.

6. Установлена стабильность субстанции КОН-1 в условиях естественного хранения при температуре 20 °С в сухом, защищенном от света месте (период наблюдения три года).

7. На основании проведённых исследований составлен проект ФСП на субстанцию КОН-1.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акопян, В. П. Влияние ноотропных средств на количественные изменения ГАМК<sub>A</sub>-рецепторных комплексов в коре мозга при экспериментальной гипокинезии / В. П. Акопян, Л. С. Балян, Н. А. Закарян // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2010. – № 7. – С. 13–15.
2. Альберт, А. Константы ионизации кислот и оснований /А. Альберт, Е. Сергент. – Москва : Химия, 1964. – 179 с.
3. Анализ лекарств в условиях аптеки / М. Н. Бушкова [и др.]. – 2-е изд., испр. и доп. – Киев : Здоров'я 1975. – 408 с.
4. Ахапкина, В. И. Новый ноотропный препарат фенотропил / В. И. Ахапкина, А. И. Григорьев // Человек и лекарство : тез. докл. IV. Рос. нац. конгр. 8 – 12 апр. 1997 г. – Москва, 1997. – С. 245.
5. N-ацильные производные 4-фенилпирролидин-2-онов, обладающие церебропротективным (ноотропным) действием / А. В. Вальдман [и др.] // Реф. журн. Химия.- 1996.- № 7.- 7027 П.
6. Бабанов, С.А. Почти все о ноотропах // Новая аптека. – 2012. – № 9, ч. 2. – С. 80–83.
7. Басс, С. М. Разработка методики количественного определения глицина в таблетках / С. М. Басс, Т. И. Ярыгина // Вестн. Перм. гос. фармац. акад. – 2008. – № 4.– С. 171–174.
8. Беликов, В. Г. Фотометрическая методика определения  $\gamma$ -амино- $\beta$ -фенилмасляной кислоты в субстанции салифена / В. Г. Беликов, М. В. Ларский // Человек и его здоровье : Курский науч.-практ. вестн. – 2008. – № 2 – С. 130–134.
9. Беллами, Л. Инфракрасные спектры молекул / Л. Беллами. – Москва : Иностр. лит., 1957. – 590 с.
10. Берштейн, И. Я. Спектрофотометрический анализ в органической химии / И. Я. Берштейн, Ю. Л. Каминский. – Ленинград : Химия, 1986. – 200 с.

11. Бойко, С. С. Фармакокинетика ноотропных лекарственных средств / С. С. Бойко, Г. Ю. Вицкова, В. П. Жердев // Эксперим. и клинич. фармакология. – 1997. – № 6. – С. 62–70.
12. Боровский, Б. В. Валидационная оценка спектрофотометрической методики количественного определения фенибута в таблетках по реакции с нингидрином // Науч. обозрение. – 2013. – № 4. – С. 222–225.
13. Булатов, М. И. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа / М. И. Булатов, И. П. Калинин. – 5-е изд., перераб. – Ленинград : Химия, 1986. – 432 с.
14. Буряк, В. П. Применение основных характеристик электронных полос поглощения в фармации // Фармация. – 1981. – Т. 30, № 2. – С. 19–23.
15. Васильева, Е. В. Влияние ноотропных средств на поведение мышей BALB/C и C57BL/6 в крестообразном лабиринте / Е. В. Васильева, Р. М. Салимов, Г. И. Ковалёв // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2012. – № 7. – С. 3–7.
16. Взаимодействие 5-арил-4-ацетил-3-гидрокси-1Н-3-пирролин-2-онов с ароматическими аминами и этилендиамином / Э. Н. Безматерных [и др.] // Енамины в органическом синтезе : материалы III урал. науч. конф. : [тез. докл.]. – Пермь, 1999. – С. 9.
17. Влияние заместителей на константы ионизации 1,5-диарил-4-ароил-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов / О.Б. Кремлева [и др.] // 80 лет фармацевтическому образованию и науке на Урале : итоги и перспективы : материалы юбилейн. межвуз. науч.-практ. конф. проф.-преподават. состава, посвящ. 275-летию г. Перми и 80-летию фармац. образования на Урале. – Пермь, 1998. – С. 73 – 75.
18. Влияние ноотропных препаратов на уровень BDNF в гиппокампе и коре мозга мышей с различной эффективностью исследовательского поведения / Ю. Ю. Фирстова [и др.] // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2009. – № 6. – С. 3–6.

19. Воронина, Т. А. Новые направления поиска ноотропных препаратов // Вестн. РАМН. – 1998. – № 11. – С. 16–21.
20. Воронина, Т. А. Ноотропные препараты, достижения и новые проблемы / Т. А. Воронина, С. Б. Середенин // Эксперим. и клинич. фармакология. – 1998. – Т. 61, № 4. – С. 3–9.
21. ВФС 42-2663-95 Пироксифер (пироксикам 0,01 и 0,02 г в капсулах).
22. Выбор условий хроматографического разделения специфических примесей в субстанциях соединений из группы производных 3-гидрокси-3-пирролин-2-она / О. Н. Кляшева [и др.] // Актуальные проблемы науки фармацевтических и медицинских ВУЗов: от разработки до коммерциализации : материалы науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 75-летию Перм. гос. фармац. акад. – Пермь, 2011. – С. 97-101.
23. Гейн, В.Л. Синтез и свойства 1-замещенных 5-арил-4-ацетил-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов // В.Л. Гейн, Л.Ф. Гейн, Н.Ю. Порсева // Петербургские встречи: симп. по органич. химии. 21-24 мая Санкт- Петербург. – Санкт-Петербург, 1995. – С.188 – 189.
24. Гейн, В. Л. Синтез и фармакологическая активность 5-арил-4-ацетил-1-карбоксииалкилтетрагидропиррол-2,3-диононов / В. Л. Гейн, Л. Ф. Гейн, Н. Ю. Порсева // Хим.-фармац. журн. – 1997. – Т. 31, № 5. – С. 33–36.
25. Гейн, В. Л. Синтез 4-ацетил-5-арил-1-карбоксииалкилтетрагидропиррол-2,3-диононов, обладающих анальгетической и ноотропной активностью / В. Л. Гейн, Л. Ф. Гейн, Н. Ю. Порсева // Человек и лекарство : материалы II Рос. нац. конгр. : [тез. докл.]. 10–15 апр. 1995 г. Москва. – Москва, 1995. – С. 14.
26. Гейн Л. Ф. Синтез, химические свойства и биологическая активность 1,4-дизамещенных 5-арил-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов : дис. ... д-ра фармац. наук / Л.Ф. Гейн. – Пермь, 2009. – 397 с.
27. Гендерные отличия в действии фенотропила и его структурного аналога соединения РГПУ-95 на тревожно-депрессивное поведение животных / И. Н.

- Тюренков [и др.] // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2010. – № 11. – С. 10–14.
28. Государственная фармакопея СССР. Вып. 1 : Общие методы анализа / М-во здравоохранения СССР. – 11-е изд., доп. – Москва : Медицина, 1987. – 336 с.
29. Государственная фармакопея СССР. Вып. 2 : Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / М-во здравоохранения СССР. – 11-е изд., доп. – Москва : Медицина, 1989. – 400 с.
30. XII Государственная фармакопея Российской Федерации: ч. 1 – Москва : Изд-во «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2008. – 704 с.
31. Губен-Вейль. Методы органической химии : в 2 т. Т. 2 : Методы анализа / Губен-Вейль. – Москва : Госхимиздат, 1963. – 1032 с.
32. Гусев, Е. И. Семакс в профилактике прогрессирования и развития обострений у больных с дисциркуляторной энцефалопатией / Е. И. Гусев, В. И. Скворцова, Е. И. Чуканова // Журн. неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2005. – № 2. – С.40–43.
33. Денеш, И. Титрование в неводных средах / И. Денеш. – Москва : Мир, 1971. – 413 с.
34. Доронин, С. Ю. Фотометрический анализ парацетамола на содержание примеси п-аминофенола / С. Ю. Доронин, Н. Н. Гусакова, Р. К. Чернова // Фармация. – 2001. – № 3. – С. 35–37.
35. Епишина, В. В. Сравнительное изучение психотропной активности гетероциклических производных гамма-аминомасляной и глутаминовой кислот : автореф. дис. канд. мед. наук / В. В. Епишина. – Волгоград, 2006. – 24 с.
36. Жданова, А. В. Психотропные и церебропротекторные свойства структурных аналогов N-карбомаил-метил-4-фенил-2-пирролидона (фенотропила) : автореф. дис. канд. мед. наук / А. В. Жданова. – Волгоград, 2011. – 24 с.

37. Иванов, В. М. Ализариновый красный С как окрашенный реагент для экстракционно-фотометрического и цветометрического определения некоторых местноанестезирующих органических оснований / В. М. Иванов, Е. М. Адамова, В. Н. Фигуровская // Журн. аналит. химии. – 2010. – Т. 65, № 9. – С. 934–942.
38. Изучение реакции КОН-1 с раствором железа (III) хлорида в применении к его количественному определению / О. Н. Кляшева [и др.] // Вестн. Перм. гос. фармацевт. акад. – 2010. – № 6. – С. 134–135.
39. К механизму действия ноопепта: снижение активности стресс-индуцируемых протеинкиназ и активация экспрессии нейротрофинов / Р. У. Островская [и др.] // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2010. – № 12. – С. 2–5.
40. Казицина, Л.А. Применение УФ, ИК, ЯМР и масс-спектропии в органической химии / Л. А. Казицина, Н. Б. Куплетская. – Москва : Изд-во МГУ, 1979. – 240 с.
41. Карапетьян, Г. В. Разработка методики количественного определения аминалона в суппозиториях // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции : сб. науч. тр. / Пятигор. гос. фармацевт. акад. – Пятигорск, 2007. – Вып. 62. – С. 298–300.
42. Кинетика проникновения семакса в мозг и кровь крыс при интраназальном введении / К. В. Шевченко [и др.] // Биоорганич. химия. – 2006. – Т. 32, № 1. – С. 64–70.
43. Кляшева, О. Н. Определение нового биологически активного соединения КОН-1 алкалиметрическим и спектрофотометрическим методами / О. Н. Кляшева, Т. И. Ярыгина // Молодая фармация – потенциал будущего : тез. II Всерос. науч. конф. студентов и аспирантов с междунар. участием. 18–19 апр. 2012 г. Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург, 2012. – Ч.1. – С. 58–59.
44. Кляшева, О. Н. Разработка методик доказательства подлинности и определения доброкачественности нового биологически активного соединения КОН-1 / О. Н. Кляшева, Т. И. Ярыгина, В. Л. Гейн // Фармация и

- общественное здоровье : материалы V междунар. науч.-практ. конф., 18 апр. 2012 г., Екатеринбург. – Екатеринбург, 2012. – С. 91–92.
45. Кляшева, О. Н. Спектрофотометрия в видимой области в количественном анализе новых биологически активных соединений из группы производных 3-пирролин-2-она / О. Н. Кляшева, К. В. Ван, Т. И. Ярыгина // Молодежная конференция «Международный год химии» : сб. материалов. – Казань, 2011. – С. 61–62.
  46. Ковалев Г. В. Ноотропные средства / Г. В. Ковалев. – Волгоград, 1990. – 368 с.
  47. Количественное определение фенибута на основе реакции с нингидрином / Т. И. Ярыгина [и др.] // Фармация. – 2004. – Т. 53, № 5. – С. 14–15.
  48. Кормош, Ж. А. Спектрофотометрическое определение пироксикама / Ж. А. Кормош, И. П. Гунька, Я. Р. Базель // Журн. аналит. химии. – 2011. – Т. 66, № 4. – С. 388–393.
  49. Коренман, И. М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений / И. М. Коренман. – Москва : Химия, 1970. – 343 с.
  50. Малкова, Я. Г. Изучение ноотропной активности в ряду производных пирролидин-2,3-диона / Я. Г. Малкова, В. П. Котегов, Н. А. Аликина // Вестн. Перм. гос. фармацевт. акад. – 2010. – № 7 – С. 245–246.
  51. Машковский, М. Д. Лекарственные средства / М. Д. Машковский. – 16-е изд., перераб., испр. и доп. – Москва : Новая Волна ; Издатель Умеренов, 2010. – 1216 с.
  52. Мельник, М. Б. Определение аскорбиновой кислоты в фармацевтических препаратах / М. Б. Мельник, И. В. Кожевников // Проблемы теоретической и экспериментальной химии : тез. докл. 17 Рос. молодёж. науч. конф., Екатеринбург, 17–20 апр. 2007. – Екатеринбург, 2007. – С. 108–109.
  53. Методы анализа лекарств / Н. П. Максютин [и др.]. – Киев.: Здоров'я, 1984. – 224 с.

54. Новые реагенты для простого и чувствительного спектрофотометрического определения карбофурана в его препаратах и в объектах окружающей среды / К. С. Кумар [и др.] // Журн. аналит. химии. – 2006. – Т. 61, № 6. – С. 608–613.
55. Одновременная потенциация AMPA рецепторов и блокада NMDA рецепторов как стратегия создания эффективных стимуляторов когнитивных функций / С. О. Бачурин [и др.] // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2010. – № 7. – С. 6–12.
56. О компенсаторных свойствах селанка при мнестических нарушениях функций, вызванных нейротоксическим воздействием на норадренергическую систему мозга крыс / И. И. Козловский [и др.] // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2008. – № 2. – С. 3–7.
57. Оптимизация процессов обучения и памяти в эксперименте с помощью селанка / Т. П. Семенова [и др.] // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2010. – № 8. – С. 2–5.
58. Оригинальный ноотропный и нейропротекторный препарат ноопепт усиливает противосудорожную активность вальпроата у мышей / Е. В. Кравченко [и др.] // Эксперим. и клин. фармакология. – 2009. - № 6. – С. 15-17.
59. ОФС 42-0034-07 Температура плавления // Государственная фармакопея Российской Федерации. – Москва, 2008. – Ч. 1. – С. 29.
60. ОФС 42-0042-07 Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях // Государственная фармакопея Российской Федерации. – Москва, 2008. – Ч. 1. – С. 56.
61. ОФС 42-0043-07 Спектрометрия в инфракрасной области // Государственная фармакопея Российской Федерации. – Москва, 2008. – Ч. 1. – С. 62.
62. ОФС 42-0046-07 Спектроскопия ядерного магнитного резонанса /// Государственная фармакопея Российской Федерации. – Москва, 2008. – Ч. 1. – С. 73.

63. ОФС 42-0049-07 Растворимость // Государственная фармакопея Российской Федерации. – Москва, 2008. – Ч. 1. – С. 92.
64. ОФС 42-0050-07 Прозрачность и степень мутности жидкостей // Государственная фармакопея Российской Федерации. – Москва, 2008. – Ч. 1. – С. 98.
65. ОФС 42-0109-09 Хлориды // Государственная фармакопея Российской Федерации. – Москва, 2008. – Ч. 2. – 3 с.
66. ОФС 42-0056-07 Сульфатная зола // Государственная фармакопея Российской Федерации. – Москва, 2008. – Ч. 1. – С. 115.
67. ОФС 42-0107-09 Сульфаты // Государственная фармакопея Российской Федерации. – Москва, 2008. – Ч. 2. – 3 с.
68. ОФС 42-0059-07 Тяжелые металлы // Государственная фармакопея Российской Федерации. – Москва, 2008. – Ч. 1. – С. 121.
69. ОФС 42-0067-07 Микробиологическая чистота // Государственная фармакопея Российской Федерации. – Москва, 2008. – Ч. 1. – С. 160.
70. ОФС 42-0074-07 Фармацевтические субстанции // Государственная фармакопея Российской Федерации. – Москва, 2008. – Ч. 1. – С. 484.
71. ОФС 42-0075-07 Сроки годности лекарственных средств // Государственная фармакопея Российской Федерации. – Москва, 2008. – Ч. 1. – С. 488.
72. ОФС 42-0087-08 Потеря в массе при высушивании // Москва : 2008. – 1 с.
73. ОФС 42-0096-09 Высокоэффективная жидкостная хроматография // Москва : 2008. – 11 с.
74. ОФС 42-0111-09 Статистическая обработка результатов химического эксперимента // Москва : 2008. – Ч. 2. – 25 с.
75. ОФС 42-0113-09 Валидация аналитических методик // Государственная фармакопея Российской Федерации. – Москва : 2008. – 12 с.
76. Оценка качества субстанции нового биологически активного соединения / О. Н. Кляшева [и др.] // Фармация. – 2013. – № 5. – С. 8–10.



77. Ошкая В. П. Нингидриновые реакции / В. П. Ошкая. – Рига : Зинатне, 1974. – 176 с.
78. Перельман, Я. М. Анализ лекарственных форм : (практ. руководство) / Я. М. Перельман. – 3-е изд. перераб. и доп. – Ленинград : МЕДГИЗ, 1961. – 616 с.
79. Петренко, В. В. Поликарбонильные соединения в фармацевтическом анализе азотсодержащих лекарственных средств : автореф. дис. ... д-ра фармац. наук / В. В. Петренко. – Харьков, 1984. – 38 с.
80. Поиск новых химических соединений с психотропной активностью в ряду производных 1-гетерилалкил-5-арил-4-ацил-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов / Н. В. Дозморова [и др.] // Вестн. Перм. гос. фармац. акад. – 2009. – № 5. – С. 74–78.
81. Простой и селективный кинетический спектрофотометрический метод определения канамицина с использованием ацетилацетон-формальдегидного реагента в среде N,N'-диметилформамида / А. С. Ахмада [и др.] // Журн. аналит. химии. – 2006. – Т. 61, № 9. – С. 943–947.
82. Простой трехкомпонентный синтез 4-ацил-5-фенил-1(2-гетерил)-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов / Т. А. Силина [и др.] // Химия гетероцикл. соединений. – 1998. – № 5. – С. 844.
83. Полюдек-Фабини, Р. Органический анализ / Р. Полюдек-Фабини, Т. Бейрих. – Ленинград : Химия, 1981. – 662 с.
84. Разработка лекарственных форм водорастворимых солей ацетилсалициловой кислоты / Ю. И. Сметанин [и др.] // Достижения современной фармацевтической науки и образования – практическому здравоохранению : материалы юбил. науч.-практ. конф, посвящ. 60-летию ПГФА. – Пермь, 1997. – С. 150.
85. Разработка методик доказательства подлинности производных 3-пирролин-2-она / О. Н. Кляшева [и др.] // Современные проблемы химической науки и образования, Чебоксары, 19–20 апр. 2012 г. – Чебоксары, 2012. – Т. 2. – С. 140–142.

86. Разработка методик анализа и установление норм качества субстанции ноопепта для инъекционных лекарственных форм / Л. Н. Грушевская [и др.] // *Вопр. биол., мед. и фармац. химии.* – 2010. – №7. – С. 35–41.
87. Разработка методик анализа субстанции ноопепта для создания государственного стандартного образца (ГСО) / А.В. Гусев [и др.] // *Хим.-фарм. журн.* – 2007. – Т.41, № 12. – С. 44–47.
88. Разработка методов количественного определения пироксикама в капсулах / Т. И. Ярыгина [и др.] // *Достижения современной фармацевтической науки и образования – практическому здравоохранению : материалы юбил. науч.-практ. конф. 10-12 апр. 1997 г. Пермь.* – Пермь, 1997. – С. 186.
89. Разработка спектрофотометрической методики определения 3-амино-1-пропанола в применении к анализу 4-ацетил-5-(4-бромфенил)-3-гидрокси-1-(3-гидроксипропил)-3-пирролин-2-она / О. Н. Кляшева [и др.] // *Актуальные проблемы науки фармацевтических и медицинских ВУЗов: от разработки до коммерциализации : материалы науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 75-летию Перм. гос. фармац. акад.* – Пермь, 2011. – С. 94–97.
90. Разработка способов стандартизации таблеток амидоксена / Т. И. Ярыгина [и др.] // *Фармация на современном этапе – проблемы и достижения : науч. тр. НИИФ.* – Москва, 2000. – Т. 39, ч. 2. – С. 184–188.
91. Свердлова, О. В. Электронные спектры в органической химии / О. В. Свердлова. – Ленинград : Химия, 1973. – 248 с.
92. Семиколенных, М. А. Синтез, свойства и биологическая активность 1-аминоалкил- и 1-диалкиламиноалкил-4-ацетил-5-арил-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов : автореф. дис. ... канд. фармац. наук / М. А. Семиколенных. – Пермь, 2007. – 22 с.
93. Сиггиа, С. Количественный органический анализ по функциональным группам : пер. с англ / С. Сиггиа, Дж. Г. Ханна. – Москва : Химия, 1983. – 672 с.

94. Сильверстейн, Р. Спектрофотометрическая идентификация органических соединений / Р. Сильверстейн, Г. Басслер, Т. Моррил. – Москва : Мир, 1977. – 590 с.
95. Спектрофотометрическое и хроматографическое определение п-аминофенола в парацетамоле / М. И. Евгенийев [и др.] // Хим.-фармац. журн. – 2000. – Т. 34, № 5. – С. 52–54.
96. Спектрофотометрическое определение димедрола с использованием его ионного ассоциата / Х. А. Мирзаева [и др.] // Фармация. – 2012. – Т. 61, № 4. – С. 18–20.
97. Спектрофотометрическое определение допамина в фармацевтических препаратах / Редди Н. Рами [и др.] // Журн. аналит. химии. – 2005. – Т. 60, № 3. – С. 284–285.
98. Спектрофотометрическое определение п-аминофенола в лекарственных препаратах при использовании 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуросана как реагента в мицеллярной среде / Р. Ф. Бакеева [и др.] // Хим.-фармац. журн. – 2010. – Т. 44, № 5. – С. 51–55.
99. Справочник химика : в 6 т. Т. 3. – 2. изд. – Москва ; Ленинград : Химия, 1964. – 1008 с.
100. Сравнительное изучение спектра психотропной активности имидазольных производных ГАМК и глутаминовой кислоты / Л. Е. Бородкина [и др.] // Успехи соврем. естествознания. – 2004. – № 12. – С. 36–37.
101. Стыскин, Е. Л. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография / Е. Л. Стыскин, Л. Б. Ициксон, Е. В. Брауде. – Москва : Химия, 1986. – 288 с.
102. Сходство цикло-пролилглицина с парацетамом по антигипоксическому и нейропротекторному эффектам / К. Н. Колясникова [и др.] // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2012. – № 9. – С. 3–6.
103. Уварова, Ю. П. Рынок ноотропных препаратов // Ремедиум. – 2010. – № 3. – С. 20–21.

104. ФС 42-0220-07 Ацетилсалициловая кислота // Государственная фармакопея Российской Федерации. – Москва, 2008. – Ч. 1. – С. 511.
105. Фарайзаде, М. А. Простой и надежный спектрофотометрический метод определения аскорбиновой кислоты в фармацевтических препаратах / М. А. Фарайзаде, С. Нагизаде // Журн. аналит. химии. – 2003. – Т. 58, № 10. – С. 1037–1044.
106. Фармакокинетика нового потенциального дипептидного ноотропного препарата ГВС-111 и его метаболитов в мозге крыс / С. С. Бойко [и др.] // Хим.-фармац. журн. – 2001. – № 9. – С. 11–13.
107. Фармакокинетика ноопепта после внутривенного введения лиофилизированной лекарственной формы у крыс / С. С. Бойко [и др.] // Хим.-фармац. журн. – 2007. – Т.41, № 3. – С. 7–8.
108. Фармакологические свойства дигама – нового потенциального ноо-тропного средства / Н. И. Андреева [и др.] // Хим.-фармац. журн. – 1998. – Т. 32, № 9. – С. 5–11.
109. Фармацевтический анализ и стандартизация таблеток ноопепта / Л. Н. Грушевская [и др.] // Хим.-фармац. журн. – 2011. – Т.45, №.6. – С. 53–56.
110. Циклическое инъекционное фотометрическое определение аскорбиновой кислоты в лекарственных препаратах / А. В. Булатов [и др.] // Журн. аналит. химии. – 2011. – Т. 66, № 3. – С. 282–286.
111. Шабанов, П. Д. Экспериментальные нарушения памяти и их фармакологическая коррекция // Вестн. акад. мед. наук СССР.– 1985. – № 9. – С. 31–37.
112. Шатц, В. Д. Высокоэффективная жидкостная хроматография / В. Д. Шатц, О. В. Сахартова. – Рига : Зинатне, 1988. – 390 с.
113. Шевченко, И. А. Взаимодействие тетрагидропиррол-2,3- дионов с бинуклеофильными реагентами / И. А. Шевченко, В. Л. Гейн // Актуальные проблемы фармацевтической науки и образования: итоги и перспективы :

материалы межвуз. науч.-практ. конф., посвящ. 85-летию высш. образования на Урале : [тез. докл.]. – Пермь, 2001. – С. 66.

114. Шевченко, И. А. Изучение влияния заместителей на константы ионизации 1,4,5- тризамещенных 3-гидрокси-3-пирролин-2-онов / И. А. Шевченко, О. Б. Кремлева, Г. Б. Богданова // Рациональное использование лекарств : материалы рос. науч.-практ. конф. : [тез. докл.]. – Москва, 2004. – С. 19–20.
115. Шевченко, И. А. Синтез и антиамнестическое действие 1-замещенных 4-ацил- и 4-метилсульфонил -5- арил-3-гидрокси-3-пирролин-2-онов / И. А. Шевченко, А. В. Катаева, В. Л. Гейн //Актуальные проблемы фармацевтической науки : материалы юбилейн. межвуз. науч.-практ. конф. : [тез. докл.]. – Пермь, 2000. – С. 98.
116. Шишкина, А. В. Изучение ноотропной активности новых производных фенотропила / А. В. Шишкина, В. В. Багметова // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины : материалы 67-ой открытой науч.-практ. конференции молодых ученых и студентов с междунар. участием. 22-24 апр. 2009 г., Волгоград. – Волгоград, 2009. – С. 184–185.
117. Шуклина, Н. С. Поиск соединений, обладающих ноотропной активностью, в ряду 3-пирролин-2-она : дис. ... канд. биол. наук / Н. С. Шуклина. – Пермь, 2001. – 145 с.
118. Экспериментальная фармакокинетика фенотропила у крыс / М. И. Антонова [и др.] // Хим.-фармац. журн. – 2003. – Т.37, № 11. – С. 7–8.
119. Экспериментальная характеристика ноотропного действия гетероциклических производных гамма-аминомасляной и глутаминовой кислот / О. В. Яценко [и др.] // X Региональная конференция молодых исследователей Волгоградской области, направление «Экспериментальные аспекты медицины», 8–11 нояб. 2005 г. : тез. докл. / под ред. М. Е. Стаценко. – Волгоград, 2005. – С. 52–53.

120. Экстракционно-фотометрическое определение димедрола и папаверина в лекарственных формах / Х. А. Мирзаева [и др.] // Журн. аналит. химии. – 2004. – Т. 59, № 3. – С. 245–249.
121. Экстракционно-фотометрическое определение триметилдоктадецил аммония бромида в препарате «Бактерицид» / М. В. Гаврилин [и др.] // Фармация. – 2012. – Т. 61, № 6. – С. 7–9.
122. Эффективность ноотропного и нейропротекторного дипептида ноопепта на стрептозоциновой модели болезни Альцгеймера у крыс / Р. У. Островская [и др.] // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2010. – № 1. – С. 2–6.
123. Ягудина, Р. И. Школа фармаколога: эффективность и безопасность ноотропных средств / Р. И. Ягудина, Л. К. Овчинникова // Рос. аптеки. – 2008. – № 10. – С. 33–37.
124. Ярыгина, Т. И. Изучение реакции пироксикама с хлоридом железа (III) в применении к его количественному определению / Т. И. Ярыгина, Л. Ф. Яковлева, З. З. Гаскарова ; Перм. гос. фармацевт. акад. – Пермь, 1998. – 12 с. – Деп. в ВИНТИ 11.03.98, № 714–В98.
125. Ярыгина, Т. И. Определение констант ионизации пироксикама / Т. И. Ярыгина, В. А. Дубовик, А. В. Захаров ; Перм. гос. фармацевт. акад. – Пермь, 1999. – 4 с. – Деп. в ВИНТИ 12.04.99, № 1106–В99.
126. Ярыгина, Т. И. Разработка методики количественного определения тауфона (таурина) // Вестн. РУДН. Сер. Медицина. – 2010. – № 4. – С. 522–525.
127. Ярыгина, Т. И. Разработка титриметрических методов количественного определения пироксикама / Т. И. Ярыгина, А. Г. Сальникова, Г. П. Вдовина ; Перм. гос. фармацевт. акад. – Пермь, 1999. – 7 с. – Деп. в ВИНТИ 15.06.99, № 1901–В99.
128. Ярыгина, Т. И. УФ спектрофотометрическое определение пироксикама / Т. И. Ярыгина ; Перм. гос. фармацевт. акад. – Пермь, 1999. – 11 с. – Деп. в ВИНТИ 24.05.99, № 1630–В99.

129. Яснецов, В. В. Исследование противогипоксических и антиамнестических свойств мексидола и семакса / В. В. Яснецов, Т. А. Воронина // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2010. – № 4. – С. 2.
130. Яснецов, В. В. Коррекция ноотропами нарушений процессов обучения и памяти, вызванных некоторыми экстремальными воздействиями / В. В. Яснецов, И. Н. Крылова, В. М. Попов // Эксперим. и клинич. фармакология. – 1996. – Т. 59, № 3. – С. 20–24.
131. Использование реакции с нингидрином в количественном определении алифатических аминов [Электронный ресурс]. / О. Н. Кляшева [и др.] // Современ. пробл. науки и образования : электрон. науч. журн. – 2013 – № 3. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/109-9160>
132. Карпенко, Ю. Н. Разработка и валидация методики определения посторонних примесей в субстанции биологически активного соединения КОН-1 [Электронный ресурс] / Ю. Н. Карпенко, О. Н. Кляшева, Т. И. Ярыгина // Современ. пробл. науки и образования : электрон. науч. журн. – 2013 – № 3. – Режим доступа : <http://www.science-education.ru/109-9618>.
133. Реестр ЛС. Фармакологическая группа – ноотропы [Электронный ресурс] // Энциклопедия лекарств и товаров аптечного ассортимента. Регистр лекарственных средств России. – Режим доступа : [http://www.rlsnet.ru/fg\\_index\\_id\\_46.htm](http://www.rlsnet.ru/fg_index_id_46.htm) 431.
134. Adams, M. Plants traditionally used in age related brain disorders a survey of ethnobotanical literature / M. Adams, F. Gmünder, M. Hamburger // J. Ethnopharmacol. – 2007. – Vol.113, 3– P. 363–381.
135. Afkhami, Ablas. Spectrophotometric Determination Salicylamid and Paracetamol in Biological Samples and Pharmaceutical Preparations by Means of the Differential Kinetic / Ablas Afkhami, Nahid Sarlak, Ali Resa Zarci // Acta chim. sloven. – 2006. – Vol. 53, № 3. – P. 351–362.

136. Amin, Alaa S. Pirokatekhinovy violet in the Pharmaceutical Analysis. Part 2. Spektrofotometric Method of Definition of Paracetamol in a Substance and Pharmaceutical Ready Forms // *Sci. pharm.* – 2001. – Vol. 69, № 2. – P. 178–179.
137. Analysis of piroxicam via its copper (II) and iron (III) complexes / S. El-Khateeb, S. Abdel Fattah, S. Abdel Rased. // *Anal. Lett.* – 1989. – Vol. 22, № 1. – P. 100–115.
138. Asad, R. Spectrophotometric determination of lisinopril in pure and pharmaceutical formulations / R. Asad, M. A. Tariq, U. R. Atta // *J. Chin. Chem. Soc.* – 2005. – Vol. 52. – P. 1055–1059.
139. Cognition enhancers between treating and doping the mind / C. Lanni [et al.] // *Pharmacol. Res.* – 2008. – № 3 – P. 196–213.
140. CNS acetylcholine receptor activity in European medicinal plants traditionally used to improve failing memory / G. Wake [et al.] // *J. Ethnopharmacol.* – 2000. – №2 – P.105–114.
141. Design and study of piracetam-like nootropics, controversial members of the problematic class of cognition-enhancing drugs / F. Gualtieri [et al.] // *Current Pharmaceutical Design.* – 2002. – № 2. – P. 125–138.
142. Effects of traditionally used anxiolytic botanicals on enzymes of the  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) system / R. Awad [et al.] // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2007. – № 9. – P 933–942.
143. Effects of vinpocetine on the redistribution of cerebral blood flow and glucose metabolism in chronic ischemic stroke patients: a PET study / G. Szilágyi [et al.] // *Journal of the Neurological Sciences.* – 2005. – P. 275–284.
144. Fehske, C J. Ginkgo biloba extract (EGb761) influences monoaminergic neurotransmission via inhibition of NE uptake, but not MAO activity after chronic treatment / C. J. Fehske, K. Leuner, W. E. Müller // *Pharmacological Research.* – 2009. – (1). – P. 68–73.
145. Giurgea, C [Pharmacology of integrative activity of the brain. Attempt at nootropic concept in psychopharmacology] ("Vers une pharmacologie de l'active



- integrative du cerveau: Tentative du concept nootrope en psychopharmacologie")" (in French). // *Actual Pharmacol* (Paris). – 1972. – P. 115–156.
146. Huskisson E, Maggini S, Ruf M. The influence of micronutrients on cognitive function and performance / E. Huskisson, S. Maggini, M. Ruf // *J. Int. Med. Res.* – 2007. – №1. – P. 1–19.
147. Indirect Spectrofluorimetric Determination of Piroxicam and Propranolol Hydrochloride in Bulk and Pharmaceutical Preparations / K. S. Ramech [et al.] // *Journal of Analytical Chemistry.* – 2003. – Vol. 58, № 10. – P. 1044–1048.
148. McDaniel, M.A. Brain-Specific Nutrients: A Memory Cure? / M. A. McDaniel, S. F. Maier, G. O. Einstein // *Psychological Science in the Public Interest*– 2002. – № 11. – P. 957–975.
149. Monoamine oxidase inhibition by *Rhodiola rosea* L. roots. / D. Diermen, van [et al.] // *J. Ethnopharmacol.* – 2009. – № 2. – P. 397–401.
150. Nomura, T. Nefiracetam facilitates hippocampal neurotransmission by a mechanism independent of the piracetam and aniracetam action / T. Nomura, T. Nishizaki // *Brain Res.* – 2000. – № 1–2. – P. 157–162.
151. Nootropic Drugs Positively Modulate  $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionic Acid-Sensitive Glutamate Receptors in Neuronal Cultures / A. Copani [et al.] // *Journal of Neurochemistry.* – 2006. – № 4. – P. 1199–1204.
152. Optimized and validated spectrophotometric methods for the determination of lisinopril in pharmaceutical formulations using ninhydrin and ascorbic acid / R. Nafisur [et al.] // *J. Braz. Chem. Soc.* – 2005. – Vol. 16. – P. 1001–1009.
153. Rajasekaran, A. Spectrophotometric determination of lisinopril in pharmaceutical formulations / A. Rajasekaran, S. Udayavani // *J. Indian Chem. Soc.* – 2001. – Vol. 78. – P. 485–486.
154. Rogers, P. Caffeine, mood and mental performance in everyday life // *Psychology Today*– 2007. – №1. – P. 84–89.

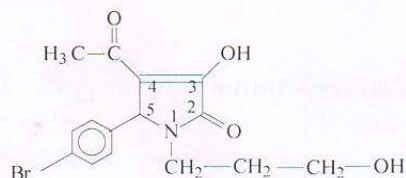
155. Selective Spectrophotometric Determination of Paracetamol With Sodium Nitroprusside in Pharmaceutical and Biological Samples / Yanyan Zhan [et al.] // Journal of Analytical Chemistry. – 2011. – Vol. 66, № 2. – P. 220–224.
156. Simple and Sensitive Spectrophotometric Method for Determination of Tricyclic Antidepressant Imipramine Using Fe (III) -SCN-Complex / Pankaj Soni [et al.] // Journal of Analytical Chemistry. – 2011. – Vol. 66, № 6. – P. 614–617.
157. Soman, I. Effect of leaves of Butea frondosa on stress, anxiety, and cognition in rats / I. Soman, S. A. Mengi, S. B. Kasture // Pharmacology, Biochemistry & Behavior. – 2004. – №1. – P. 11–16.
158. Spectrophotometric Determination of Acyclovir and Amantadine Hydrochloride through Metals Complexation / A. A. Mustapha [et al.] // Journal of Analytical Chemistry. – Vol. 59, № 1. – P. 40–45.
159. Spectrophotometric Determination of Ampicillin, Amoxycillin and Carbenicillin Using Folin-Ciocalteu Phenol Reagent / A. S. Ahmad [et al.] // Journal of Analytical Chemistry. – 2004. – Vol. 59, № 2. – P. 138–142.
160. Spectrophotometric determination of lisinopril in pharmaceuticals using ninhydrin – a modified approach / K. Basavaiah [et al.] // J. Food Drug. Anal. – 2009. – Vol. 17, № 2. – P. 93–99.
161. Spectrophotometric Determination of Antiallergic Drug in Bulk Powder and in Its Pharmaceutical Formulations / B.G. Gowda [et al.] // Journal of Analytical Chemistry. – 2003. – Vol. 58, № 6. – P. 571–575.
162. Spectrophotometric Determination of Metoclopramide in Pharmaceutical Preparations / Zh. Shah [et al.] // Journal of Analytical Chemistry. – 2005. – Vol. 60, № 7. – P. 711–714.
163. Spectrophotometric Methods for the Determination of Nelfinavir Mesylate / S.W.M. Mohan Rao [et al.] // Journal of Analytical Chemistry. – 2004. – Vol. 59, № 6. – P. 621–626.

164. Stewart, M. G, Enhancement of long-term memory retention by Colostrinin in one-day-old chicks trained on a weak passive avoidance learning paradigm / M. G. Stewart, D. Banks // *Neurobiol Learn Mem.* – 2006. – (1). – P. 66–71.
165. The influence of piracetam on actual driving behaviour of elderly subjects / W. J. Riedel [et al.] // *Human Psychopharmacology. Clinical & Experimental.* – 1998. – № 2. – P. 108–114.
166. Towards better brain management: nootropics. / R. Malik [et al.] // *Curr. Med. Chem.* – 2007. – № 2. – P 123–131.
167. Vaglenova, J. Can nootropic drugs be effective against the impact of ethanol teratogenicity on cognitive performance? / J. Vaglenova, V. V. Petkov // *European Neuropsychopharmacology.* – 2001. – № 1. – P. 33–38.

## **ПРИЛОЖЕНИЯ**

## ОТЧЕТ ПО СОСТАВЛЕНИЮ РАЗДЕЛОВ МБЧ

Образцы представлены кафедрой фармацевтической химии аспиранта Кляшевой О.Н.



4-ацетил-5-(4-бромфенил)-3-гидрокси-1-(3-гидроксипропил)-3-пирролин-2-он (КОН-1)

### Раздел "Микробиологическая чистота" в ФСП

Субстанция КОН-1 в условиях проведения испытания (разведение 1:10) не обладает антимикробным действием.

Испытания проводятся по ГФ XII изд. в соответствии с требованиями. В 1 г. препарата допускается не более 1000 аэробных бактерий и 100 дрожжевых и плесневых грибов при отсутствии *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *B.coli* (кат. 3А)

### **В пояснительную записку к разделу "Микробиологическая чистота"**

Препарат в условиях проведения испытания на микробиологическую чистоту (разведение 1:10) не обладает антимикробным действием в отношении рекомендованных тест-микроорганизмов. Испытание антимикробного действия проводили в соответствии с методом ГФ XII изд, Результаты представлены в таблице 1.

**Таблица 1 - Результаты антимикробной активности**

| Разведение препарата | Тест-микрорганизмы.              |                                 |                                  |                                 |                                   |                                      |                                |
|----------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
|                      | <i>B.cereus</i><br>АТСС<br>10702 | <i>E. coli</i><br>АТСС<br>25922 | <i>S.abony</i><br>ГИСК<br>103/39 | <i>P.aeruginosa</i><br>ГИСК 453 | <i>S.aureus</i><br>АТСС<br>6538-Р | <i>C.albicans</i><br>АТСС<br>885-653 | <i>A.niger</i><br>ВКМФ<br>1119 |
| 1:10                 | +                                | +                               | +                                | +                               | +                                 | +                                    | +                              |
| 1:20                 | +                                | -                               | -                                | +                               | +                                 | +                                    | +                              |
| 1:50                 | +                                | +                               | +                                | +                               | +                                 | +                                    | +                              |
| 1:100                | +                                | +                               | +                                | +                               | +                                 | +                                    | +                              |
| Контроль культуры    | +                                | +                               | +                                | +                               | +                                 | +                                    | +                              |

Обозначение: + - наличие роста тест- микроорганизмов, -- отсутствие роста.

Как видно из таблицы препарат не обладает антимикробным действием в отношении рекомендованных тест-микроорганизмов.

**Таблица 2 - Результаты микробиологической чистоты**

| № | Образцы    | Кол-во бактерий | Кол-во грибов | E. coli | S.aureus | P.aeruginosa |
|---|------------|-----------------|---------------|---------|----------|--------------|
| 1 | Образец №1 | 60              | 40            | Отсут.  | Отсут.   | Отсут.       |
| 2 | Образец №2 | 60              | 70            | Отсут.  | Отсут.   | Отсут.       |
| 3 | Образец №3 | 50              | 30            | Отсут.  | Отсут.   | Отсут.       |

**Вывод:** Образцы препарата соответствуют требованиям ГФ XII по показателю «Микробиологическая чистота»

Исполнитель: ст. лаборант

Баландина А.В.

Руководитель лаборатории, профессор



Одегова Т. Ф.

Подпись: *Одегова Т. Ф.*  
 заверяю: *Т. Ф. Одегова*  
 (инж. отдела кадров)

СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА  
**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ**

Государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Пермская государственная фармацевтическая академия»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России

**КОН – 1, субстанция**

Настоящая фармакопейная статья предприятия распространяется на  
лекарственное средство КОН-1, субстанция

**ПРОИЗВОДИТЕЛЬ**

ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России

**ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)**

ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России

**УПАКОВЩИК (ВТОРИЧНАЯ/ТРЕТИЧНАЯ УПАКОВКА)**

ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России

**ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА**

ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России

**ЗАЯВИТЕЛЬ (в ФГУ «НЦ ЭСМП»)**

ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России

## СПЕЦИФИКАЦИЯ на КОН-1, субстанцию

ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России

| Показатели                        | Методы   | Нормы   |
|-----------------------------------|--|---|
| <b>Описание</b>                   | Органолептический. ГФ XII, ч.1, с. 17, 484               | Белый кристаллический порошок, без запаха   |
| <b>Растворимость</b>              | ГФ XII, ч. 1, с. 92                                      | Легко растворим в диметилформамиде, мало растворим в спирте 96%, практически не растворим в воде  |
| <b>Подлинность</b>                | Инфракрасная спектроскопия                               | Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области от 4000 до 400 см <sup>-1</sup> по положению полос поглощения должен соответствовать рисунку спектра КОН-1 (Приложение). |
|                                   | Ультрафиолетовая спектрофотометрия                       | Ультрафиолетовый спектр поглощения 0,001% раствора субстанции в области от 220 до 350 нм должен иметь максимум при 328 ± 1 нм.  |
|                                   | Качественная реакция с 3% раствором железа(III) хлорида  | Появление красного окрашивания.   |
|                                   | Качественная реакция с кислотой серной концентрированной | Появление красного окрашивания.   |
| <b>Температура плавления</b>      | ГФ XII, ч.1, с. 29, метод 1                              | От 212 до 214 °С  |
| <b>Кислотность или щелочность</b> | ГФ XII, ч. 1   | Окраска метилового красного должна измениться от прибавления не более 0,15 мл 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты или 0,01 М раствора натрия гидроксида.                                     |
| <b>Посторонние примеси</b>        | ВЭЖХ   | Любая единичная неидентифицированная примесь - не более 0,25%; сумма примесей - не более 0,5%.  |
| <b>3-Аминопропанол</b>            | Спектрофотометрия  | Не более 0,05%  |



|                                       |  |   |
|---------------------------------------|--|---|
| <b>Хлориды</b>                        | ГФ XI, вып. 1, с. 165  | Не более 0,01%  |
| <b>Сульфаты</b>                       | ГФ XI, вып. 1, с. 165  | Не более 0,05%  |
| <b>Сульфатная зола</b>                | ГФ XII, ч. 1, с. 115   | Не более 0,1%   |
| <b>Тяжелые металлы</b>                | ГФ XII, ч. 1, с. 121; метод 1).  | Не более 0,001%   |
| <b>Потеря в массе при высушивании</b> | ГФ XI, вып. 1, с. 176  | Не более 0,5%   |
| <b>Микробиологическая чистота</b>     | ГФ XII, ч. 1, с. 160   | Категория 2.2   |
| <b>Количественное определение</b>     | Титриметрический метод   | Не менее 99,0% $C_{15}H_{16}NO_4Br$ в пересчете на сухое вещество |
| <b>Упаковка</b>                       | По 1 кг в банки из стекломассы оранжевого цвета с винтовой горловиной типа БВ-1000-28 по ОСТ 64-2-71-80 с навинчиваемыми пластмассовыми крышками и прокладками по ОСТ 64-2-87-81. На банки наклеивают этикетки из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86 |   |
| <b>Маркировка</b>                     | Соответствует ФС   |   |
| <b>Транспортирование</b>              | ГОСТ 17768-90  |   |
| <b>Хранение</b>                       | В сухом защищенном от света месте при температуре не выше 25 °С.   |   |
| <b>Срок годности</b>                  | 2 года   |   |

**«Утверждаю»**

Проректор по учебно-воспитательной работе ГБОУ ВПО  
«Пермская государственная фармацевтическая академия»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
профессор  И.В. Алексеева

« 18 » февраля 2014 г.

### АКТ ВНЕДРЕНИЯ результатов исследований по разработке проекта ФСП на субстанцию КОН-1

1. **Наименование разработки.** Проект фармакопейной статьи предприятия (ФСП) на субстанцию КОН-1 (4-ацетил-5-(4-бромфенил)-3-гидрокси-1-(3-гидроксипропил)-3-пирролин-2-он).
2. **Место разработки ФСП.** Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтической химии факультета очного обучения, кафедра токсикологической химии, кафедра микробиологии, кафедра общей и органической химии.
3. **Разработчики ФСП.** Аспирант кафедры фармацевтической химии ФОО Кляшева О.Н., доцент кафедры токсикологической химии, к.ф.н. Карпенко Ю.Н., профессор кафедры фармацевтической химии ФОО, д.ф.н. Ярыгина Т.И., заведующий кафедрой микробиологии, д.ф.н. профессор Одегова Т.Ф., заведующий кафедрой общей и органической химии, д.х.н., профессор Гейн В.Л., доцент кафедры фармацевтической химии ФОО, к.ф.н. Саттарова О.Е.
4. **Результаты внедрения.** Стандартизованные в соответствии с требованиями ФСП серии субстанции КОН-1 используются на кафедрах токсикологической химии и физиологии с основами анатомии при проведении НИР по разработке методик определения указанного соединения в биожидкостях методом ВЭЖХ и твердофазной экстракции из плазмы крови для цели исследования токсикокинетики. Работы проводятся к.ф.н., доцентом Карпенко Ю.Н., к.ф.н., ст. преподавателем Тумилович Е.Ю. и к.б.н., доцентом Чащиной С.В.

Заведующий кафедрой токсикологической химии,  
д.ф.н., профессор



Т.Л. Малкова

Заведующий кафедрой физиологии с основами анатомии,  
д.м.н., профессор



Б.Я. Сыропятов

14 февраля 2014 г.



**МЕДИСОРБ**  
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПАНИЯ

Закрытое акционерное общество «Медисорб»  
614113, Россия, г. Пермь, ул. Гальперина, 6  
Тел/факс: (342) 283-67-66  
E-mail: info@medisorb.ru  
www.medisorb.ru

№ \_\_\_\_\_

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

«Утверждаю»

Директор по науке

ЗАО «Медисорб», г. Пермь

проф. *Вдовина* Г.П. Вдовина

« 03 » \_\_\_\_\_ 2012 г.



## АКТ АПРОБАЦИИ

### методик контроля качества субстанции КОН-1

(4-ацетил-5-(4-бромфенил)-3-гидрокси-1-(3-гидроксипропил)-3-пирролин-2-он)  
согласно проекту ФСП

- Наименование разработки.** Проект фармакопейной статьи предприятия (ФСП) на субстанцию КОН-1.
- Место разработки методик.** Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтической химии факультета очного обучения, кафедра токсикологической химии.
- Разработчики методик.** Аспирант кафедры фармацевтической химии ФОО Кляшева О.Н., доцент кафедры токсикологической химии, к.ф.н. Карпенко Ю.Н., профессор кафедры фармацевтической химии ФОО, д.ф.н. Ярыгина Т.И.
- Результаты апробации методик.** Апробация методик проведена в лаборатории физико-химических методов анализа ЗАО «Медисорб» на трех сериях субстанции КОН-1. Проект ФСП составлен в соответствии с требованиями ОСТ 91500.05.001.00 «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения». Результаты, полученные при испытаниях, соответствуют показателям и требованиям проекта ФСП. Предложенные методики позволяют получить точные результаты, обладают достаточной чувствительностью и специфичностью.

Ведущий инженер-химик лаборатории  
физико-химических методов анализа

*Иванцов*

Е.Н. Иванцов

Начальник лаборатории физико-химических  
методов анализа, к. фарм. наук

*Иванцова*

Н.Ю. Иванцова

« 08 » *мая* 2012 г.



**МЕДИСОРБ**  
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПАНИЯ

Закрывтое акционерное общество «Медисорб»  
614113, Россия, г. Пермь, ул. Гальперина, 6  
Тел/факс: (342) 283-67-66  
E-mail: info@medisorb.ru  
www.medisorb.ru

№ \_\_\_\_\_  
На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

«Утверждаю»

Директор по науке

ЗАО «Медисорб», г. Пермь

проф.

*Вдовина* Г.П. Вдовина

2012 г.



## АКТ АПРОБАЦИИ

**Наименование разработки:** Унифицированная методика определения примесей метилового эфира ацетилпировиноградной кислоты и бензальдегида (4-бромбензальдегида) в субстанциях ВКВ-1 (4-ацетил-3-гидрокси-1-(5-карбокспентил)-5-фенил-3-пирролин-2-он) и КОН-1 (4-ацетил-5-(4-бромфенил)-3-гидрокси-1-(3-гидроксипропил)-3-пирролин-2-он) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Методика включена в проект ФС на субстанции ВКВ-1 и КОН-1.

**Место разработки:** Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, кафедра токсикологической химии, кафедра фармацевтической химии факультета очного обучения.

**Авторы:** Докторант доцент Карпенко Ю.Н., аспирант Кляшева О.Н., аспирант Ван К.В., профессор Ярыгина Т.И.

**Место апробации:** ЗАО «Медисорб», г. Пермь, лаборатория физико-химических методов анализа.

**Результаты апробации:** Методика апробирована на трех сериях субстанций соединений ВКВ-1 и КОН-1 и трех сериях модельных смесей, содержащих субстанции ВКВ-1 или КОН-1 и примеси метилового эфира ацетилпировиноградной кислоты и бензальдегида (4-бромбензальдегида) (всего 12 объектов). Исследована приемлемость условий хроматографирования при анализе метанольных растворов модельных смесей субстанций ВКВ-1 и КОН-1 (1 мг/мл) и указанных примесей в количестве 0,5% (0,005 мг/мл).

Методика даёт точные результаты, обладает достаточной чувствительностью и специфичностью. Методика может быть использована

ЗАО «Медисорб», 614113, Россия, г. Пермь, ул. Гальперина, 6, Тел/факс: (342) 283-67-66  
E-mail: info@medisorb.ru, www.medisorb.ru

для анализа субстанций ВКВ-1 и КОН-1 по разделу ФС «Посторонние примеси».

Ведущий инженер-химик лаборатории  
физико-химических методов анализа



Е.Н. Иванцов

Начальник лаборатории физико-химических  
методов анализа, к. фарм. наук



Н.Ю. Иванцова

«28» мая 2012 г.

«Утверждаю»  
 Проректор по учебно-воспитательной работе ГБОУ ВПО  
 «Пермская государственная фармацевтическая академия»  
 Министерства здравоохранения и социального развития  
 Российской Федерации,  
 профессор

И.В. Алексеева

«10» мая 2012 г.

### АКТ ВНЕДРЕНИЯ

- 1. Наименование предложения или внедрения:** Физико-химические и химические свойства, методики количественного определения (алкалиметрического титрования и спектрофотометрии в видимой области) субстанции соединения КОН-1 (4-ацетил-5-(4-бромфенил)-3-гидрокси-1-(3-гидроксипропил)-3-пирролин-2-он).
- 2. Место разработки:** Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, кафедра фармацевтической химии факультета очного обучения.
- 3. Авторы:** Аспирант кафедры фармацевтической химии ФОО Кляшева О.Н., доцент кафедры фармацевтической химии ФОО, к.ф.н. Саттарова О.Е., профессор кафедры фармацевтической химии ФОО, д.ф.н. Ярыгина Т.И.
- 4. Место внедрения:** Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, кафедра фармацевтической химии факультета очного обучения.
- 5. Форма внедрения:** Результаты исследований использованы при разработке учебно-методического информационного комплекса (УМИК) «Анализ по функциональным группам (енольный гидроксил)» для дистанционного обучения студентов 3 курса фармацевтических ВУЗов.
- 6. Эффективность внедрения:** УМИК позволяет реализовать учебный процесс с применением кейс-технологии. Способствует успешному усвоению студентами анализа лекарственных средств по функциональным группам. Информировует студентов о научных исследованиях, проводимых в ГБОУ ВПО ПГФА.

Зав. кафедрой фармацевтической химии ФОО,  
 д.ф.н., профессор

Коркодинова Л.М.

«10» мая 2012 г.

Фармацевтический анализ  
лекарственных средств по  
функциональным группам

Дистанционный курс

# Енольный гидроксил

Подлинность субстанции КОН-1

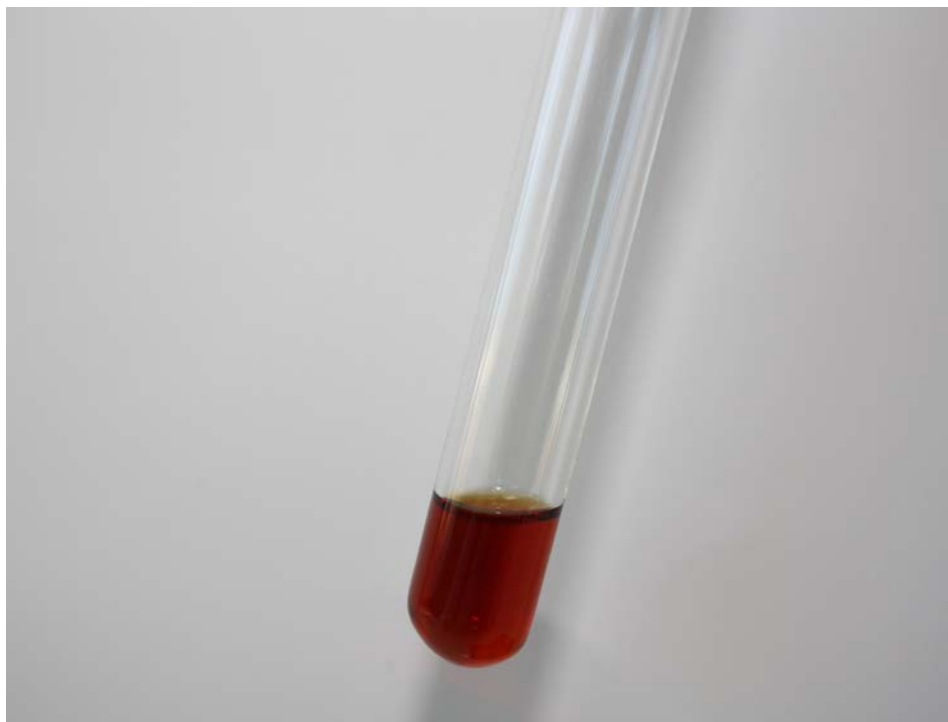


## **1. Реакция комплексообразования с ионами железа(III)**

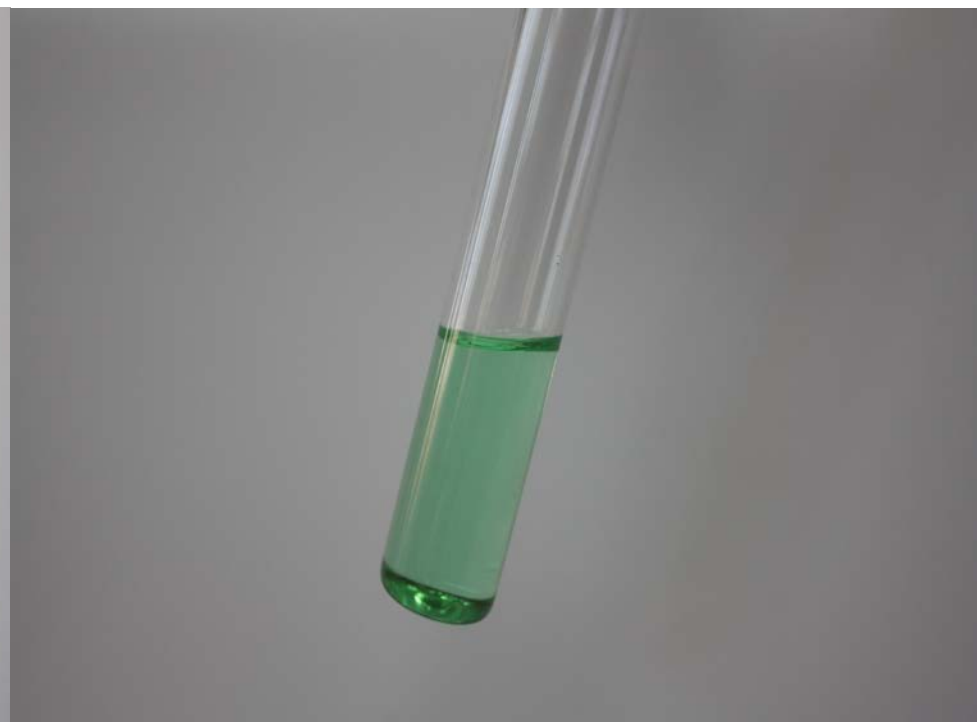
Методика. 0,02 г субстанции или КОН-1 растворяют в 2 мл диметилформамида, прибавляют 0,05 мл 3 % раствора железа(III) хлорида; появляется красное окрашивание.

## **2. Реакция комплексообразования с ионами меди(II)**

Методика. 0,02 г субстанции КОН-1 растворяют в 2 мл диметилформамида, прибавляют 0,1 мл 10% раствора меди(II) сульфата; появляется зеленое окрашивание.



**Реакция с раствором железа (III) хлорида**



**Реакция с раствором меди(II) сульфата**