

УДК 543.544,543.89

DOI: 10.26896/1028-6861-2017-83-11-17

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И РАЗРАБОТКА
МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ (2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-4,7-ДИМЕТИЛ-2-
(ТИОФЕН-2-ИЛ)ОКТАГИДРО-2*H*-ХРОМЕН-4-ОЛА,
ОБЛАДАЮЩЕГО ВЫСОКОЙ АНАЛЬГЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

© А. В. Ластовка^{1,2}, В. П. Фадеева^{1,2}, И. В. Ильина^{1,2},
С. Ю. Курбакова¹, К. П. Волчо^{1,2}, Н. Ф. Салахутдинов^{1,2}

Статья поступила 7 апреля 2017 г.

Методами элементного анализа, УФ-, ИК-, ЯМР ¹H- и ¹³C-спектроскопии доказаны состав и строение (2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2*H*-хромен-4-ола. Определен ряд физико-химических свойств: температура плавления, молекулярная масса, показатели «прозрачность», «цветность» и «рН»; влажность методом Фишера и сульфатная зола. Выполнен качественный анализ субстанции, основанный на индофениновой реакции. Разработана методика определения действующего вещества методом ВЭЖХ и проведена ее валидация. Содержание вещества, определенное с помощью предложенной методики, составляет от 99,4 до 100,7 %. Предел обнаружения и предел определения соединения составляют 0,78 и 2,4 мкг/мл соответственно.

Ключевые слова: (2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2*H*-хромен-4-ол (диметилтиохроменол); УФ-, ИК-, ЯМР ¹H- и ¹³C-спектроскопия; элементный анализ; высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ); валидация.

¹ Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН, г. Новосибирск, Россия.

² Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск, Россия; e-mail: fadeeva@nioch.nsc.ru

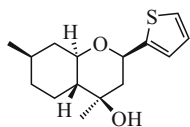


Рис. 1. Структурная формула (2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2*H*-хромен-4-ола ($C_{15}H_{22}O_2S$, $M_r = 266,38$)

Диметилтиохроменол (2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2*H*-хромен-4-ол (I) (рис. 1), получаемый из монотерпеноида (–)-изопулегола, обладает высокой анальгетической активностью в сочетании с низкой токсичностью [1]. Соединение I при пероральном введении мышам в дозе всего 1 мг/кг оказывает пролонгированный анальгетический эффект, который сохраняется в течение 24 ч. Для дальнейшего возможного внедрения диметилтиохроменоло в медицинскую практику и контроля его безопасности необходимо знать характеристики вещества и способ его определения.

Целью работы были изучение физико-химических свойств и разработка методики определения действующего вещества в субстанции методом ВЭЖХ, а также ее валидация.

Экспериментальная часть. Для исследования использовали серийные образцы субстанции I, синтезированной Отделом Медицинской Химии НИОХ СО РАН и очищенной путем кристаллизации. (2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-4,7-Диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2*H*-хромен-4-ол получали реакцией тиофен-2-карбальдегида с (–)-изопулеголом в присутствии катализатора глины K10. К суспензии 1,30 г глины K10 в 10 мл CH_2Cl_2 прибавляли 0,290 г тиофен-2-карбальдегида, затем раствор 0,400 г (–)-изопулегола в 10 мл CH_2Cl_2 . Отгоняли растворитель, реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч. Добавляли 15 мл этилацетата, катализатор отфильтровывали, отгоняли растворитель. Разделение реакционной смеси проводили с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (Macherey-Nagel 60 – 200 μ), элюент — этилацетат в гексане, от 0 до 100 % [1].

Электронные спектры поглощения (ЭСП) в ультрафиолетовой, видимой и ближней ИК-областях записывали с использованием спектрофотометра Varian Cary 5000 (США) в метиловом спирте ($l = 1$ см).

ИК-спектры в области 4000 – 400 cm^{-1} получали с использованием ИК-Фурье спектрометра Bruker TENSOR 27 (Германия) в таблетках KBr (1 мг субстанции I добавляли к 150 мг KBr).

Спектры 1H и ^{13}C ЯМР записывали с помощью спектрометра Bruker AV-400 в растворе $CDCl_3$ с использованием стандартных методик.

Элементный анализ выполняли с использованием автоматического CHNS/O-элементного анализатора EuroVector EA-3000 (Италия). Кроме того, C и H определяли гравиметрическим методом ускоренного сжигания, а серу — титриметрически после сжигания вещества в колбе, наполненной кислородом.

Температуру плавления измеряли с помощью термосистемы Mettler Toledo FP900 (Швейцария) со скоростью нагрева 1 и 5 $^{\circ}C/мин$.

Молекулярную массу определяли методом паровой осмометрии с помощью парового осмометра Knauer K-7000 (Австрия) (субстанцию I растворяли в ацетоне), а также с использованием масс-спектрометра высокого разрешения DFS (Thermo Scientific) в режиме полного сканирования (15 – 500 m/z , 70 эВ, прямое введение образца).

Показатель «рН» измеряли для растворов I в метиловом и этиловом спирте с помощью иономер-кондуктометра Инфраспек-Аналит Анион-4154 (Россия).

Хромато-масс-спектрометрический анализ проводили с использованием прибора, включающего газовый хроматограф Agilent 6890N и хромато-масс-спектрометрическую систему Agilent 5973N (ЭУ, 70 эВ). Использовали капиллярную колонку HP-5MS ((5 %)–дифенил–(95 %)–диметилсилоксан): 30 м $\times$ 0,25 мм $\times$ 0,25 мкм, газ-носитель — гелий (1 мл/мин). Режим повышения температуры колонки: 2 мин при 50 $^{\circ}C$, от 50 до 280 $^{\circ}C$ со скоростью 10 $^{\circ}C/мин$, 30 мин при 280 $^{\circ}C$; температура испарителя — 280 $^{\circ}C$; температура источника ионов — 230 $^{\circ}C$; скорость сканирования — 1,2 скан/с в области масс 30 – 800 а.е.м.

Для определения металлов применяли атомно-эмиссионный спектрометр с микроволновой плазмой Agilent Technologies 4100 MP-AES (Австралия). Разложение образцов субстанции I проводили в микроволновой системе автоклавного растворения Milestone ETHOS One (Италия). В качестве разлагающей смеси использовали 8 мл конц. HNO_3 и 2 мл 30 %-ного раствора H_2O_2 .

Хроматографический анализ субстанции I проводили методом ВЭЖХ с использованием жидкостного хроматографа «Миличром А-02» (ЗАО «ЭкоНова», г. Новосибирск) с градиентным насосом и УФ-детектором (190 – 360 нм), программное обеспечение — пакет «МультиХром 1.5х-Е» (ЗАО «Амперсенд», г. Новосибирск).

Результаты и их обсуждение. По внешнему виду субстанция I — желтовато-белая смесь крупнокристаллического и кристаллического порошка; легко растворима в ацетонитриле, метиловом спирте, ацетоне и хлороформе; растворима в этиловом спирте; практически не растворима в воде.

Значения температуры плавления субстанции I при скоростях нагрева термосистемы Mettler Toledo FP900 1 и 5 $^{\circ}C/мин$ составили 141,8 – 142,1 и 141,7 $^{\circ}C$ соответственно. При термоаналитическом исследовании в токе He со скоростью нагревания 10 $^{\circ}C/мин$ температура начала разложения вещества равна 210 $^{\circ}C$. Температура, при которой суммарное изменение массы достигает максимального значения на кривой ДТГ, — 246 $^{\circ}C$. Температура плавления на кривой ДСК совпадает со значением, определенным с помощью термосистемы при 5 $^{\circ}C/мин$ (рис. 2).

Показатели «Прозрачность» и «Цветность» определяли для 0,20 %-ных растворов соединения I в ацетонитриле. По показателю «Прозрачность» все образцы были прозрачными или их мутность не превышала мутности эталонного раствора I [2, С. 98 – 100]. По показателю «Цветность» образцы были бесцветными по сравнению с растворителем или не превышали эталон ВУ₇ [2, с. 93 – 98]. Также измеряли показатель pH в растворах метилового и этилового спирта (табл. 1). Содержание воды в этиловом спирте не превышало 5 %, в метиловом спирте — 0,05 %.

Результаты определения молекулярной массы методом паровфазной осмометрии: 264,40; 266,30 ($n = 2$) (расчетное значение — 266,13). Расхождение между рассчитанными и найденными значениями составляли 0,1 – 2,0 % отн. Результаты масс-спектрометрического анализа: 266,1332 (M^+ , $C_{15}H_{22}O_2S^+$; расчетное значение — 266,1335).

Содержание воды в образцах было определено по методу К. Фишера (табл. 2).

Исследование сульфатной золы использовали для определения неорганических примесей в органическом веществе I (табл. 3) [2, с. 115]. Среднее значение сульфатной золы составило 0,011 % от массы навески.

Методом атомно-эмиссионной спектроскопии с микроволновой плазмой определяли следующие элементы: Na, Mg, Al, K, Ca, Fe и Ba. Разложение образцов диметилтиохромена проводили в микроволновой системе автоклавного растворения, используя в качестве разлагающей смеси 8 мл конц. HNO_3 и 2 мл 30 %-ного раствора H_2O_2 . Режим разложения представлен в табл. 4. Далее полученные после разложения растворы количественно переносили в бидистиллированной водой в мерные колбы вместимостью 100 мл. При анализе растворов найдены следовые содержания Mg и Fe (<1,50 ppm). Не обнаружены Na, Al, K, Ca и Ba.

Элементный анализ проводили с применением автоматического CHNS/O-анализатора, а также классическим гравиметрическим методом. Проанализировали 4 серийных образца соединения I. В результате найдено (%): C 67,50; H 8,16; O 12,0; S 11,88. Вычислено (%): C 67,62; H 8,32; O 12,01; S 12,04 [3].

По данным хромато-масс-спектрометрии (метод внутренней нормировки) вычислено процентное содержание действующего вещества для 3 партий образца, которое составило $99,7 \pm 0,6$ ($n = 3$; $P = 0,95$); хро-

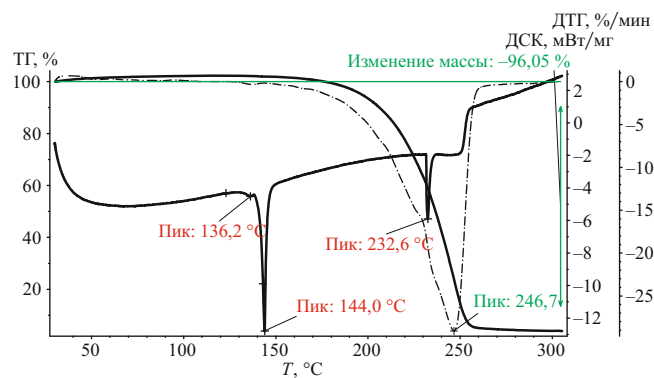


Рис. 2. Термические кривые (ТГ, ДТГ и ДСК в He при скорости нагрева 10 °C/мин) субстанции I

матограммы получали в диапазоне масс от 29 до 650 Да.

В ИК-спектрах субстанции I присутствуют следующие характеристические полосы (cm^{-1}): 3496 — валентные колебания связи —OH, 2841 – 2989 — валентные колебания —CH₂– и —CH₃ групп, 688 — монозамещенное ароматическое кольцо тиафена (рис. 3).

В УФ-спектре раствора I в метиловом спирте в области от 200 до 800 нм присутствовал один максимум при 233 нм (рис. 4). Для расчета коэффициента экстинкции измеряли оптическую плотность растворов субстанции I в ацетонитриле при $\lambda = 234$ нм в интервале концентраций от 36,8 до 128,7 мкмоль/л и получили $\epsilon = 8826,6$ л/(см · моль).

Проведен качественный анализ субстанции I, основанный на реакции производных тиафена с 1,2-дикетонами в сернокислой среде (индофениновая

Таблица 2. Содержание воды в образцах субстанции I

Номер образца	Масса образца, мг	Содержание воды, %
1	26,0	0,30
2	22,7	0,25

Среднее значение: 0,28 %.

Таблица 3. Результаты определения сульфатной золы

Номер образца	Навеска ($m_2 - m_1$), г	Масса сульфатной золы ($m_3 - m_1$), г	Сульфатная зола, %
1	0,3130	0,0001	0,032
2	0,3111	0	0
3	0,3015	0	0

Таблица 4. Параметры разложения в микроволновой системе

Стадия	Мощность, Вт	Температура, °C	Время, мин
1	350	100	4
2	500	110	4
3	500	120	4
4	500	130	4
5	750	140	4
6	750	140	60

Таблица 1. Показатель pH для спиртовых растворов субстанции I ($V_{\text{спирта}} = 10$ мл, $V_{H_2O} = 20$ мл)

Навеска образца, мг	pH водного раствора этанола	pH этанольного раствора субстанции I
4,5	6,10	6,06
Навеска образца, мг	pH водного раствора метанола	pH метанольного раствора субстанции I
3,8	6,00	5,99

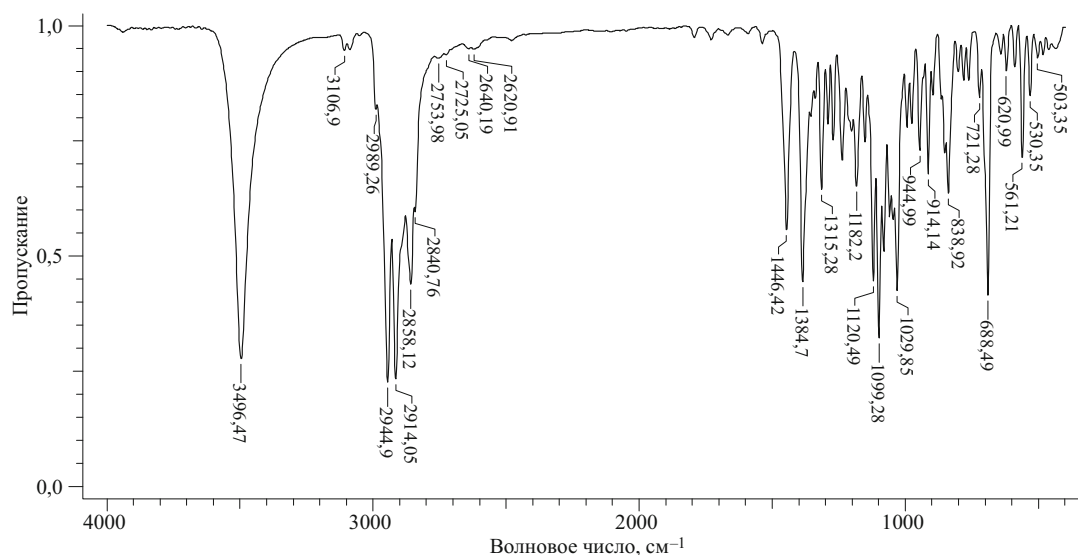


Рис. 3. ИК-спектр субстанции I в KBr

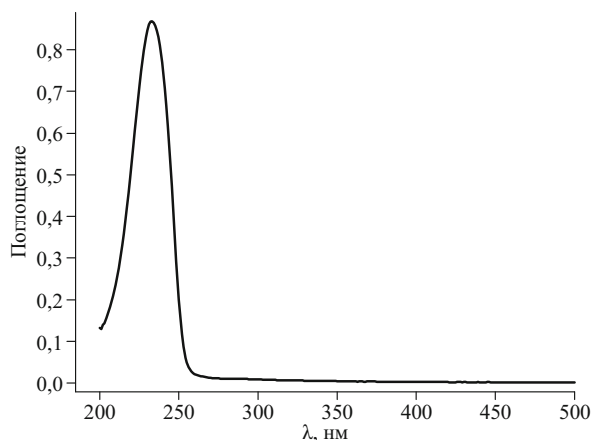
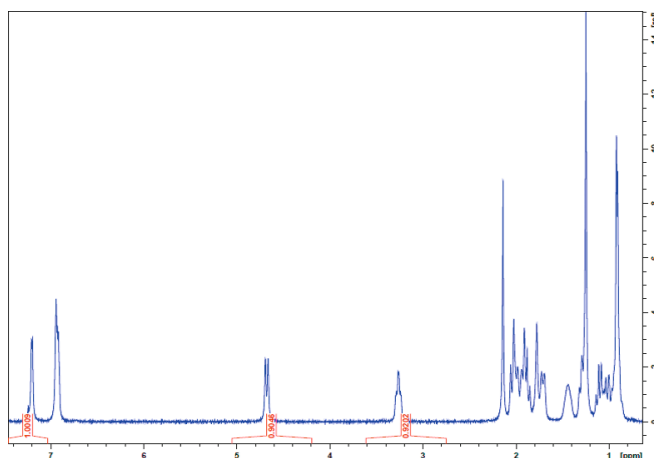


Рис. 4. УФ-спектр субстанции I в метиловом спирте

Рис. 5. Спектр ЯМР ^1H субстанции I в CDCl_3

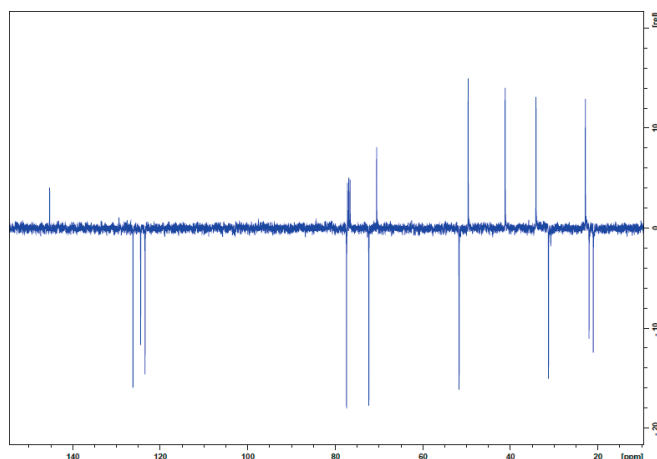
реакция). Известно, что окраска, появляющаяся при индофениновой реакции, зависит от заместителей в тиафеновом цикле. При отсутствии заместителей в обоих α -положениях в большинстве случаев появляется темно-синяя окраска. Если остаются незамещенными только одно α -положение и соседнее β -положение, окраска обычно светло-синяя, но часто окраска бывает зеленой или фиолетовой [4]. При смешивании разбавленного раствора исследуемого соединения I в этиловом спирте с концентрированной серной кислотой, содержащей несколько миллиграммов изатина, получили раствор фиолетового цвета, что подтверждает наличие тиафенового кольца с одним заместителем в α -положении.

В спектрах ЯМР ^1H соединения I (рис. 5), растворенного в CDCl_3 (концентрация I — 12,5 мг/мл), δ , м.д., наблюдались следующие сигналы: 0,91 (д, $J(16,9) = 6,5$ Гц, 3H, H-16); 0,83 – 0,96 (м, 1H, H_a-8); 1,02 (м, 1H, H_a-7); 1,11 (м, 1H, H_a-10); 1,25 (с, 3H, H-15); 1,37 – 1,52 (м, 1H, H_a-9); 1,65 – 2,09 (H_c-8, H_a-4, H_c-7, H_c-10, H_c-4); 2,14 (с, 1H, –OH); 3,26 (ддд, $J(1a,$

10a) = $J(1a, 6a) = 10,5$ Гц, $J(1a, 10e) = 4,0$ Гц, 1H, H_a-1); 4,68 (д, $J(3a, 4a) = 11,62$ Гц, 1H, H_a-3); 6,92 (д, $J(13,12) = 4,52$ Гц, 1H, H-13); 6,94 (м, 1H, H-14); 7,20 (д, $J(12,13) = 4,70$ Гц, 1H, H-12). В спектрах ЯМР ^{13}C соединения I (рис. 6), растворенного в CDCl_3 (концентрация I — 12,5 мг/мл), δ , м.д., наблюдались следующие сигналы: 77,45 (д, C-1); 72,71 (д, C-3); 49,63 (т, C-4); 70,54 (с, C-5); 51,70 (д, C-6); 22,84 (т, C-7); 34,14 (т, C-8); 31,28 (д, C-9); 41,19 (т, C-10); 145,26 (с, C-11); 124,47 (д, C-12); 126,21 (д, C-13); 123,48 (д, C-14); 21,06 (кв, C-15); 22,01 (кв, C-16).

Нумерация атомов соединения I для ЯМР ^1H и ^{13}C спектров приведена на рис. 7.

Разработана методика определения субстанции I методом ВЭЖХ с применением микроколоночного жидкостного хроматографа «Милихром А-02» с УФ-детектором. Использовали хроматографическую колонку размером 2×75 мм, заполненную обращенно-фазовым сорбентом ProntoSIL 120-5-C18 AQ #0838. В качестве элюента применяли раствор три-

Рис. 6. Спектр ЯМР ^{13}C субстанции I в CDCl_3

фторуксусной кислоты с концентрацией 1 г/л (А), ацетонитрил (В) в градиентном режиме (табл. 5). Скорость подачи подвижной фазы составляла 130 мкл/мин, время измерения — 0,18 с, температура термостата колонки — 35 °С и объем пробы — 20 мкл. Исследованию подвергали растворы серийных образцов субстанции I в ацетонитриле. Длина волны при детектировании была равна 234 нм.

Далее проводили оценку аналитической методики (АМ) по следующим характеристикам: специфичность, предел обнаружения, предел определения, линейность, правильность, прецизионность, надежность и стабильность растворов [5].

Специфичность для хроматографической методики подтверждали набором хроматограмм ($n = 5$), как минимум: а) растворителя образца; б) раствора сравнения; в) испытуемого раствора [6]. Хроматографическую систему можно считать пригодной: относительное стандартное отклонение для пяти параллельных определений площади пика раствора сравнения и испытуемого раствора не превышает 5 %; фактор асимметрии не превышает 2,00 и эффективность колонки — не менее 2000 ТТ. Таким образом, доказана специфичность аналитической методики для определения действующего вещества в субстанции диметилтиохромена и отсутствие пиков, которые могут соответствовать посторонним примесям.

Для доказательства специфичности методики также требовалось показать разделение диметилтиохромена с его стереоизомером, близким по свойствам (рис. 8). В качестве критерия полноты разделения пиков использовали коэффициент разделения R_s , который составил 0,90.

Для установления предела обнаружения, т.е. наименьшего количества (концентрации) вещества в образце, которое может быть обнаружено с применением валидируемой методики [7], использовали соотношение сигнал/шум. Установили минимальное количество вещества в образце, при котором отношение ана-

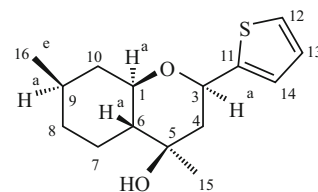
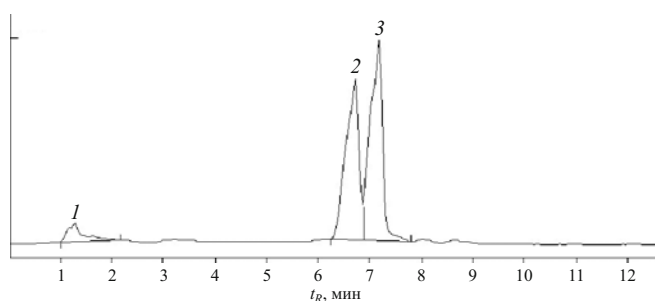
Рис. 7. Нумерация атомов соединения I для спектров ЯМР ^1H и ^{13}C 

Рис. 8. Хроматограмма разделения (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ола с его стереоизомером

литического сигнала к уровню шумов было не менее 3. Найденная концентрация составила 0,78 мкг/мл.

Предел определения, т.е. наименьшее количество (концентрация) вещества в образце, которое может быть количественно оценено с использованием валидируемой методики с требуемой правильностью и внутрилабораторной (промежуточной) прецизионностью [7], оценивали по соотношению сигнал/шум. Минимальная концентрация определяемого вещества в образце, при которой отношение аналитического сигнала к уровню шума составляет 10:1, равна 2,4 мкг/мл.

Для построения градуировочной характеристики использовали рабочий стандартный образец (РСО) с максимальным содержанием действующего вещества по данным ГХ-МС (99,7 %): $y = 595,38x$, $R^2 = 0,9971$. Линейный динамический диапазон — от 2 до 49 мкг/мл. Этот диапазон использовали для количественного анализа, но погрешность определения меньше в интервале концентраций от 2 до 7 мкг/мл. При необходимости будет проведена валидация методики в более широком интервале концентраций субстанции I.

Для того чтобы дать оценку правильности полученных результатов, наряду со значением открывае-

Таблица 5. Профиль градиента при определении субстанции I

Время, мин	А, %	В, %
0 – 3,5	50	50
3,5 – 10,4	20	80
10,4 – 17,3	0	100

мости R (%) определяли ее доверительный интервал при заданной вероятности ($P = 95\%$) [6, 8]: $\bar{R} \pm \Delta R$.

Весь исследуемый диапазон концентраций разделили на три отрезка: 1) нижний; 2) средний; 3) верхний и провели определения концентраций раствора с неизвестным содержанием диметилтиохроменоло в каждом из трех интервалов ($n = 5$). При количественном анализе субстанции с высоким нормируемым содержанием основного вещества (98 % и выше) открываемость не должна выходить за пределы 99,0 – 101,0 %. Результаты оценки правильности методики представлены в табл. 6.

Прецизионность можно оценивать в трех вариантах: как повторяемость (сходимость); внутрилабораторную (промежуточную) прецизионность; межлабораторную прецизионность (воспроизводимость) [9, 10], но с использованием однородных образцов.

Повторяемость результатов определения оценивали следующим образом. В одной лаборатории в один день один и тот же аналитик готовил в одинаковых условиях 3 испытуемых раствора, охватывающих нормируемую по методике область концентраций. Брали гомогенизированный порошок таблеток одной серии и готовили по 1 испытуемому раствору на каждом из 3 уровней концентраций — 50, 100, 150 % (от концентрации раствора стандартного образца по тестируемой методике). Регистрировали хроматограммы ($n = 5$), затем рассчитывали содержание определяемого вещества, средний результат ($\bar{R}$), стандартное отклонение (SD) и относительное стандартное отклонение (RSD) отдельного результата. Требовалось показать, что при определении основного вещества в суб-

станциях $RSD \leq 1,0\%$ [6]. Обработка экспериментальных данных проведена с исключением промахов по Q -тесту (табл. 7).

Внутрилабораторную (промежуточную) прецизионность валидируемой методики оценивали в условиях работы одной лаборатории (разные дни, разные исполнители, разное оборудование и т.д.) (табл. 8).

Для двух выборок рассчитанное значение t -критерия ($P = 95\%$; $f = m_1 + m_2 - 2 = 47$) равно 0,2347, что меньше табличного значения, значит, различия средних результатов анализа статистически незначимы.

Для доказательства надежности хроматографической методики изменяли скорость потока подвижной фазы. При уменьшении скорости потока параметры пригодности системы изменялись в рамках критических значений. Растворы субстанции I стабильны в течение 3 ч при 0 °С.

Проведенные валидационные тесты доказывают, что разработанная аналитическая методика является специфичной, точной и достоверной для определения действующего вещества в субстанции (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ола.

Таким образом, определен ряд физико-химических свойств субстанции I: растворимость в разных растворителях, молекулярная масса, температура плавления, спектральные характеристики, цветность и прозрачность, pH в метанольном и этанольном растворах, количество сульфатной золы, влажность. Методом атомно-эмиссионной спектроскопии с микроволновой плазмой в субстанции определены следовые количества Mg и Fe (<1,50 ppm). Состав и строение син-

Таблица 6. Результаты проверки правильности методики определения действующего вещества в субстанции диметилтиохроменоло методом ВЭЖХ ($n = 5$; $P = 0,95$)

Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	R , %	$\bar{R}$, %	SD	RSD	$\bar{R} \pm \Delta R$
6,34	6,37, 6,29, 6,33, 6,32, 6,36	100,5, 99,2, 99,8, 99,7, 100,3	99,9	0,5	0,5	$99,9 \pm 0,6$
6,20	6,14, 6,21, 6,19, 6,20, 6,23	99,0, 100,2, 99,8, 100,0, 100,5	99,9	0,5	0,5	$99,9 \pm 0,7$
3,00	3,01, 2,98, 2,95, 3,02, 3,03	100,3, 99,3, 98,3, 100,7, 101,0	99,9	1,1	1,1	100 ± 1

Таблица 7. Результаты оценки повторяемости методики определения действующего вещества в субстанции диметилтиохроменоло методом ВЭЖХ

Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	n	R , %	$\bar{R}$, %	SD , %	RSD , %
9,20	9,24, 9,22, 9,24, 9,21	4	100,4, 100,2, 100,4, 100,1	100,3	0,2	0,2
6,20	6,14, 6,21, 6,19, 6,20, 6,23	5	99,0, 100,2, 99,8, 100,0, 100,5	99,9	0,5	0,5
3,10	3,16, 3,09, 3,10, 3,13, 3,11	5	101,9, 99,7, 100,0, 101,0, 100,3	100,4	0,6	0,6

Таблица 8. Результаты оценки внутрилабораторной прецизионности методики определения действующего вещества в субстанции диметилтиохроменоло методом ВЭЖХ

Номер выборки	Выборка результатов	X_{cp}	SD , %
1	99,3, 100,0, 100,3, 100,6, 100,4, 98,9, 100,4, 100,2, 100,4, 100,1, 99,6, 99,9, 99,7, 100,1, 100,3, 100,4, 99,0, 100,2, 99,8, 100,0, 100,5, 101,3, 100,5, 100,5, 101,9, 99,7, 100,0, 101,0, 100,3, 100,5, 100,5, 101,0, 101,0, 99,5	100,2	0,6
2	99,3, 98,7, 103,2, 100,0, 99,2, 99,6, 98,4, 98,4, 101,2, 98,8, 102,5, 100,5, 101,5, 100,0, 102,5	100,3	1,6

тезированной субстанции доказаны данными элементного анализа, ИК-, ЯМР ^1H - и ^{13}C -спектроскопии. Найдены способы идентификации и определения субстанции I. Качественный анализ основан на появлении фиолетовой окраски раствора при индофениновой реакции. Разработана методика определения диметилтиохромена методом ВЭЖХ и проведена ее валидация. Показано, что содержание действующего вещества, определенное с помощью предложенной методики, составляет от 99,4 до 100,7 %.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nazimova E., Pavlova A., Mikhilchenko O., et al. Discovery of highly potent analgesic activity of isopulegol-derived (2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-4,7-dimethyl-2-(thiophen-2-yl)octahydro-2*H*-chromen-4-ol / Med. Chem. Res. 2016. Vol. 25. N 7. P. 1 – 15.

2. Государственная фармакопея РФ XII. Ч. 1. — М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. — 704 с.
3. Фадеева В. П., Тихова В. Д. Количественный элементный анализ органических веществ и материалов: учеб.-метод. пособие. — Новосибирск: Изд-во НГУ, 2014.
4. Губен-Вейль. Методы органической химии. Т. 2. — М.: Госхимиздат, 1963. С. 621.
5. Nishant T., Arun Kumar, Sathish Kumar D., Vijaya Shanti B. Development and Validation of Analytical Methods for Pharmaceuticals / J. Anal. Bioanal. Tech. 2011. Vol. 2. N 127. P. 1 – 5.
6. Эпштейн Н. А. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе (обзор) / Хим.-фарм. журн. 2004. Т. 38. № 4. С. 40 – 56.
7. Государственная фармакопея РФ XIII. Т. 1. ОФС.1.1.0012.15. — М.: Министерство здравоохранения РФ, 2015. — 1470 с.
8. Эрмер Й., Миллер Д. Валидация методик в фармацевтическом анализе: примеры наилучшей практики. — М.: Группа компаний ВИА-ЛЕК, 2013. — 495 с.

UDC 543.544, 543.89

STUDY OF PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND DEVELOPMENT OF THE TECHNIQUE FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF (2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-4,7-DIMETHYL-2-(THIOPHEN-2-YL)OCTAHYDRO-2*H*-CHROMEN-4-OL WHICH EXHIBITS HIGH ANALGESIC ACTIVITY

© A. V. Lastovka, V. P. Fadeeva, I. V. Il'ina, S. Yu. Kurbakova, K. P. Volcho, and N. F. Salakhutdinov

Submitted April 7, 2017.

Composition and structure of (2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-4,7-dimethyl-2-(thiophen-2-yl)octahydro-2*H*-chromen-4-ol are determined using elemental analysis, UV-, IR-, NMR ^1H - and ^{13}C -spectrometry. A number of physicochemical parameters — melting point, molecular weight, “pellucidness,” “chromacity” and pH; humidity (after Fisher) and sulphated ash — are determined. A qualitative determination of the substance is based on the indophenine reaction between thiophene and isatin with sulfuric acid present. A method of quantitative determination of the active substance and validation of the procedure is developed using HPLC. Content of the active substance determined by the proposed method ranges from 99.4 to 100.7%. The detection and quantification limits are 0.78 and 2.4 µg/ml, respectively.

Keywords: (2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-4,7-dimethyl-2-(thiophen-2-yl)octahydro-2*H*-chromen-4-ol (dimethylthiochrome-nol); UVS, IRS, ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy; elemental analysis; vapor phase osmometry; gas chromatography-mass spectrometry; high performance liquid chromatography; validation.

REFERENCES

1. Nazimova E., Pavlova A., Mikhilchenko O., et al. Discovery of highly potent analgesic activity of isopulegol-derived (2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-4,7-dimethyl-2-(thiophen-2-yl)octahydro-2*H*-chromen-4-ol / Med. Chem. Res. 2016. Vol. 25. N 7. P. 1 – 15.
2. State pharmacopeia of the Russian Federation XII. Part 1. — Moscow: Nauchnyi tsentr ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya, 2008. — 704 p. [in Russian].
3. Fadeeva V. P., Tikhova V. D. Quantitative elemental analysis of organic substances and materials: educational textbook. — Novosibirsk: Izd. NGU, 2014 [in Russian].
4. Guben-Veil'. The methods of organic chemistry. Vol. 2. — Moscow: Goskhimizdat, 1963. P. 621 [in Russian].

5. Nishant T., Arun Kumar, Sathish Kumar D., Vijaya Shanti B. Development and Validation of Analytical Methods for Pharmaceuticals / J. Anal. Bioanal. Tech. 2011. Vol. 2. N 127. P. 1 – 5.
6. Épshtein N. A. Evaluation of the suitability of HPLC techniques in pharmaceutical analysis (review) / Khim.-Farm. Zh. 2004. Vol. 38. N 4. P. 40 – 56 [in Russian].
7. State pharmacopeia of the Russian Federation XIII. Vol. 1. OFS.1.1.0012.15. — Moscow: Ministerstvo zdravookhraneniya RF, 2015. — 1470 p.
8. Ermer J., Miller J. H. M. B. Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice. — Wiley – VCH Verlag GmbH & Co, 2005.