

УДК 615.072

<https://www.doi.org/10.34907/JRQAI.2022.29.24.001>

## МЕТОД УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ В АНАЛИЗЕ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО 2-АМИНОПИРРОЛА С ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ

**А.Т. Цечёев**, аспирант кафедры токсикологической химии, ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» (ФГБОУ ВО ПФГА), г. Пермь, [arthurtse@yandex.ru](mailto:arthurtse@yandex.ru)

**Ю.Н. Карпенко**, канд. фарм. наук, доцент кафедры токсикологической химии, ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» (ФГБОУ ВО ПФГА); ООО «Парма Клиникал», г. Пермь, [karpenko\\_pfa@mail.ru](mailto:karpenko_pfa@mail.ru)

**Н.М. Игидов**, доктор фарм. наук, профессор кафедры общей и органической химии, ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» (ФГБОУ ВО ПФГА), г. Пермь

*Изучены особенности поглощения нового биологически активного соединения 2-амино-1-(4-бромфенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксамид (2-АБФПК) в УФ-диапазоне спектра. Установлено влияние pH среды и растворителя на характер электронного спектра соединения. Разработана и валидирована спектрофотометрическая методика количественного определения 2-АБФПК в субстанции с использованием стандартного образца. Предложенная методика в пределах аналитической области соответствует фармакопейным критериям приемлемости по показателям: специфичность, линейность, правильность, прецизионность.*

**Ключевые слова:** противоопухолевые средства, производные 2-аминопиррола, оценка качества, УФ-спектрофотометрия, валидация

Несмотря на совершенствование методов диагностики и лечения, заболеваемость онкологическими заболеваниями в России неуклонно растет [2]. Соответственно, увеличивается потребление пациентами противоопухолевых

лекарственных средств. Так, в январе 2022 года объем продаж препаратов данной группы вырос почти на 40% по сравнению с 2021-м [8].

Приоритетным направлением политики Российской Федерации является обеспечение населения эффективными лекарственными средствами [6]. Необходимое условие доступности лекарственной помощи – разработка отечественных инновационных препаратов, в том числе для лечения онкологических заболеваний [4,7].

В Пермской государственной фармацевтической академии активно изучаются замещенные производные 2-аминопиррола, которые обладают выраженной противоопухолевой и антиоксидантной активностью при малой токсичности. Синтезированное на кафедре органической химии соединение 2-амино-1-(4-бромфенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксамид (2-АБФПК) (рис. 1) проявило цитотоксический эффект в отношении широкого спектра опухолевых клеток человека [1] и было рекомендовано для дальнейшего углубленного изучения [9].

Разработка методик стандартизации новых биологически активных соединений является

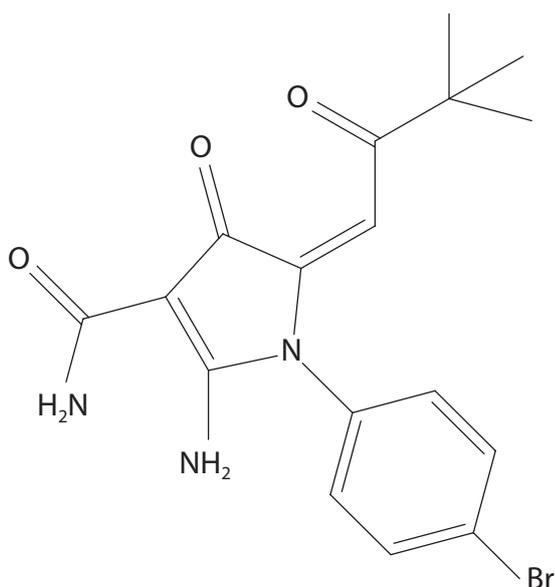


Рис. 1. Структурная формула 2-АБФПК

необходимым этапом доклинических исследований. Широкое применение в фармацевтическом анализе нашел метод спектрофотометрии в ультрафиолетовой (УФ) области спектра благодаря высокой чувствительности, информативности, доступности и простоте выполнения аналитических процедур. Метод используется для установления подлинности, чистоты, количественного определения как индивидуальных, так и многокомпонентных лекарственных средств [3].

Наличие в структуре 2-АБФПК хромофорных групп свидетельствует о способности соединения поглощать свет в УФ-диапазоне и предполагает возможность использования спектрофотометрического метода для оценки качества субстанции и потенциальных лекарственных препаратов на ее основе. Таким образом, **целью** исследования явилась разработка условий определения биологически активного соединения 2-АБФПК методом УФ-спектрофотометрии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования выступали три серии субстанции 2-АБФПК, синтезированные

в 2021 году. В качестве растворителей использовали метанол («Реахим», хч); воду очищенную; 0,1 М раствор кислоты хлористоводородной; 0,1 М раствор натрия гидроксида.

Измерения проводили на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu), используя в качестве раствора сравнения соответствующий растворитель.

С учетом нерастворимости субстанции 2-АБФПК в воде и водных растворах кислот испытуемые растворы и раствор стандартного образца готовили по следующей методике.

Около 50 мг (точная навеска) субстанции (стандартного образца) помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 20 мл метанола, доводили до метки тем же растворителем и перемешивали (раствор А). Затем 1,0 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили до метки одним из вышеуказанных растворителей (раствор Б). Концентрация 2-АБФПК в растворе Б составляет 0,001%.

В качестве стандартного образца использовали субстанцию 2-АБФПК, дважды перекристаллизованную из этанола и высушенную до постоянной массы.

Оптическую плотность испытуемых и стандартных растворов измеряли при длине волны 263 нм в кварцевых кюветах с толщиной слоя 10 мм.

Количественное содержание основного вещества в субстанции (%) рассчитывали по следующей формуле:

$$\chi = \frac{A_x \times a_0 \times 50 \times 100 \times 100}{A_0 \times a_1 \times 50 \times 100} = \frac{A_x \times a_0 \times 50 \times 100}{A_0 \times a_1},$$

где  $A_x$  – оптическая плотность испытуемого раствора;  $A_0$  – оптическая плотность раствора СО;  $a_1$  – навеска субстанции, в граммах;  $a_0$  – навеска СО, в граммах.

Валидацию методики проводили по следующим параметрам: специфичность, линейность, правильность и прецизионность с учетом требований Государственной фармакопеи (ГФ) XIV [5].

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2019.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Электронные спектры 0,001% растворов 2-АБФПК, измеренные в диапазоне от 200 до 400 нм, представлены на рис. 2.

УФ-спектры растворов 2-АБФПК в воде и 0,1 М растворе кислоты хлористоводородной имеют 2 максимума поглощения – при 223 нм и 250 нм. В щелочном растворе (рН более 12) характер спектра соединения изменяется: появляются 2 выраженных максимума – при 216 нм и 336 нм. Такое изменение, вероятно, объясняется переходом соединения

в имидольную форму за счет слабых кислотных свойств амидной группы. На наличие имидольной формы 2-АБФПК указывает и растворимость вещества в растворах сильных щелочей.

Вследствие сольватохромного эффекта в УФ-спектре метанольного раствора 2-АБФПК в сравнении со спектрами «нейтральных» и «кислых» водных растворов наблюдается bathochromный сдвиг полос поглощения и значительное увеличение интенсивности поглощения во втором максимуме (263 нм).

Дальнейшие исследования по разработке спектрофотометрической методики анализа соединения 2-АБФПК было принято проводить с использованием в качестве растворителя метанола. Выбор растворителя обосновывался наличием выраженного максимума поглощения в спектре метанольного раствора 2-АБФПК ( $\lambda_{\text{max}} = 263 \text{ нм}$ ), высоким значением показателя удельного поглощения ( $E_{1\text{см}}^{1\%} = 540$ ), стабильностью значений оптической плотности, а также практическим

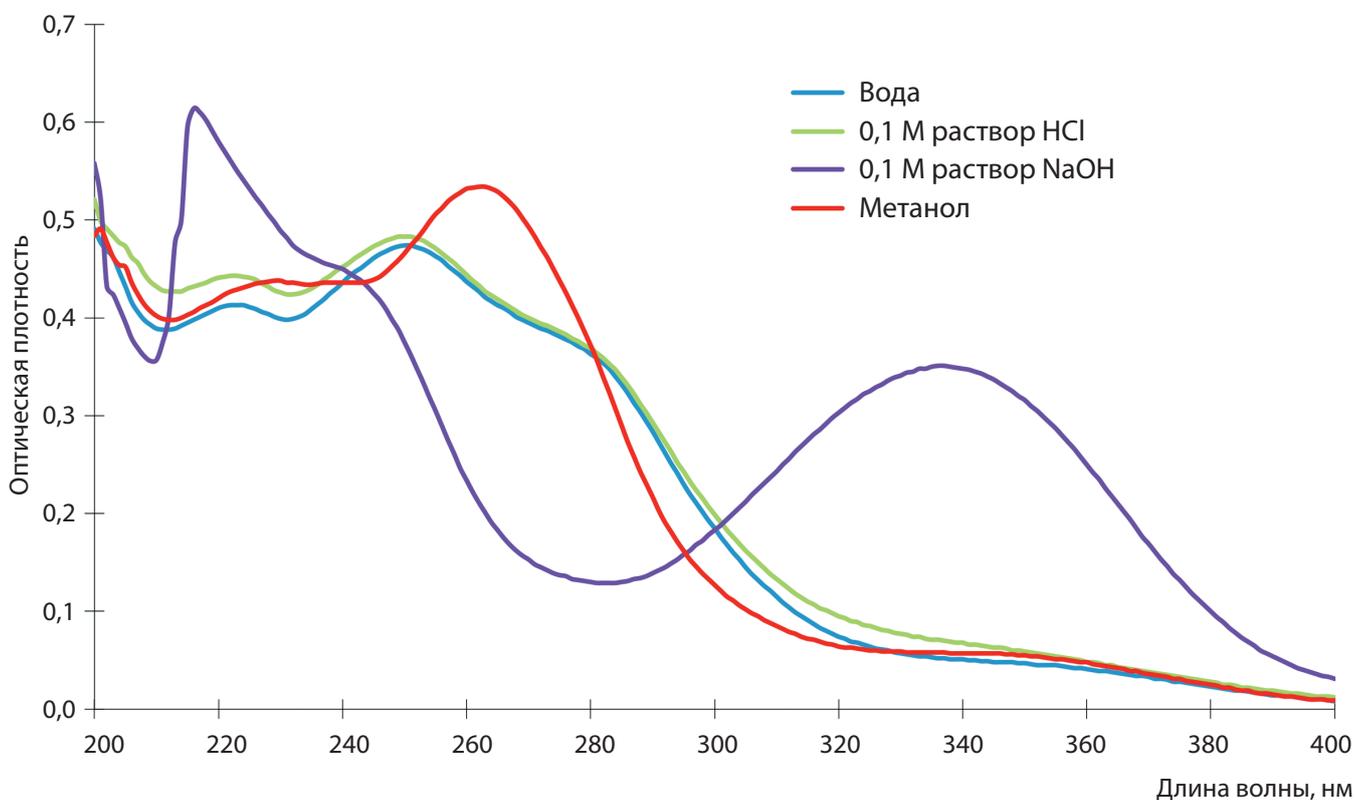
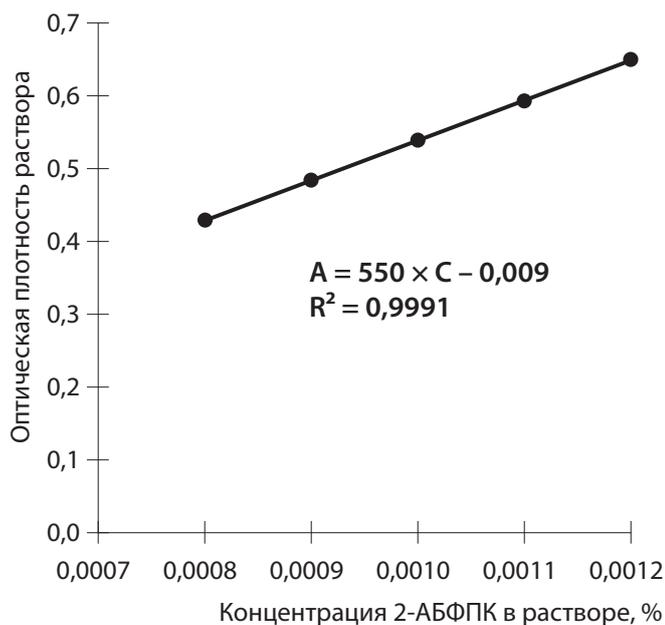


РИСУНОК 2. УФ-спектры поглощения 2-АБФПК



**РИСУНОК 3.** График зависимости оптической плотности от концентрации раствора 2-АБФПК

удобством приготовления испытуемых растворов, предусматривающим применение одного растворителя.

*Специфичность* методики оценивали путем сравнения УФ-спектров испытуемых растворов трех серий субстанции со спектром стандартного образца 2-АБФПК. Наблюдали полное соответствие положений максимума

(263 нм), минимума поглощения (213 нм), плато (в области от 227 до 244 нм).

*Линейность* методики исследовали в диапазоне от 80 до 120% от номинальной концентрации изучаемого соединения в испытуемом растворе (0,001%). Всего было приготовлено и проанализировано пять калибровочных растворов. Измерение оптической плотности (A) растворов производили при аналитической длине волны 263 нм. Калибровочный график приведен на рис. 3.

Полученные данные подтверждают линейную зависимость оптической плотности от концентрации 2-АБФПК в растворе в пределах аналитической области методики. Коэффициент корреляции составил 0,9991, что соответствует фармакопейным требованиям, предъявляемым к методикам количественного определения.

Для оценки прецизионности (сходимости) методики в разработанных условиях было получено 6 результатов количественного определения одной серии субстанции 2-АБФПК (табл. 1). Содержание 2-АБФПК (%) в субстанции рассчитывали с учетом оптической плотности раствора стандартного образца. Относительное стандартное отклонение среднего

Таблица 1

### РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ ПРЕЦИЗИОННОСТИ МЕТОДИКИ

№	Навеска субстанции 2-АБФПК, г	Оптическая плотность испытуемого раствора	Навеска СО, г	Оптическая плотность раствора СО	Рассчитанное содержание, %
1	0,0523	0,561	0,0509	0,545	100,17
2	0,0545	0,598	0,0488	0,536	99,89
3	0,0519	0,553	0,0551	0,581	101,04
4	0,0566	0,612	0,0526	0,569	99,96
5	0,0510	0,549	0,0494	0,531	100,14
6	0,0573	0,615	0,0548	0,592	99,35

Метрологические характеристики:  $\bar{X}$ сп. = 100,09%; SD = 0,55; RSD = 0,55%

**РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ ПРАВИЛЬНОСТИ МЕТОДИКИ**

№	Введено, г	Оптическая плотность испытуемого раствора	Найдено, г	Открываемость, R, %	Метрологические характеристики
1	0,0410	0,433	0,0405	98,71	R <sub>ср.</sub> = 99,62% SD = 0,84 RSD = 0,84% ΔR <sub>ср.</sub> = ± 0,65% t-критерий Стьюдента (расчет.) = 1,36
2	0,0396	0,420	0,0393	99,14	
3	0,0408	0,432	0,0404	98,97	
4	0,0498	0,535	0,0500	100,42	
5	0,0511	0,550	0,0514	100,60	
6	0,0528	0,561	0,0524	99,31	
7	0,0636	0,674	0,0630	99,06	
8	0,0604	0,653	0,0610	101,05	
9	0,0621	0,660	0,0617	99,34	
Примечание: навеска CO – 0,0544 г, оптическая плотность раствора CO – 0,582					

значения содержания вещества в субстанции составило 0,55%, что свидетельствует о схожести результатов анализа.

Правильность методики устанавливали путем анализа модельных растворов с концентрациями 2-АБФПК, соответствующими 80, 100 и 120% от номинального содержания в испытуемом растворе. Для каждого уровня концентрации готовили по три испытуемых раствора. По результатам количественного определения рассчитывали величину открываемости (R) соединения 2-АБФПК (табл. 2).

Установлено, что при использовании разработанной спектрофотометрической методики открываемость соединения 2-АБФПК находится в пределах 98–102%, истинное значение открываемости (100%) лежит внутри доверительных интервалов средних результатов анализа. Расчетное значение критерия Стьюдента не превышает табличного значения (2,31), что указывает на отсутствие значимой систематической ошибки и валидность методики по параметру «правильность».

**ВЫВОДЫ**

На основании изучения особенностей поглощения нового биологически активного соединения 2-АБФПК в УФ-области спектра разработана спектрофотометрическая методика, позволяющая проводить его анализ в субстанции по показателям «подлинность» и «количественное определение».

В ходе валидационной оценки было установлено, что методика специфична, позволяет получать точные и воспроизводимые результаты в пределах аналитической области.

**БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК**

1. 2-амино-1-(4-бромфенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксамид, проявляющий цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток человека. Патент Рос.

- Федерация №2020130076; заявл. 14.09.20; опублик. 17.08.21, бюлл. №23. – 9 с.
- Каприн А.Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2020 году / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021. – Илл. – С. 16–18.
  - Волокитина Д.С., Озеров А.А., Лазарян Д.С., Волокитин С.В. Разработка и валидация спектрофотометрической методики количественного определения субстанции нового биологически активного соединения производного хиназолин-4(3H)-она // Вестник ВолГМУ. – 2017. – №2 (62). – С. 36–38.
  - Инновационные лекарственные препараты на российском фармацевтическом рынке: ключевые игроки и основные направления разработок / А.А. Чапленко, В.В. Власов, Г.Н. Гильдеева // Ремедиум. – 2020. – №10. – С. 4–9.
  - ОФС.1.1.0012.15 ГФ XIV. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.femb.ru/feml> (дата обращения 01.04.22).
  - Постановление правительства РФ от 15 апреля 2014 г. №305 «Об утверждении государственной программы Российской Федерации «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности» [Электронный ресурс] // URL: <https://docs.cntd.ru/document/499091775?marker=656010> (дата обращения 31.03.22).
  - Приказ Министерства здравоохранения РФ от 13 февраля 2013 г. №66 «Об утверждении Стратегии лекарственного обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 года и плана ее реализации». [Электронный ресурс] // Гарант.ру: информационный портал. URL: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70217532/> (дата обращения 30.03.22).
  - Фармацевтический рынок России. Январь 2022 года [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://dsm.ru/docs/analytics/%D0%AF%D0%BD%D0%B2%D0%B0%D1%80%D1%8C%202022%20%D0%98%D1%82%D0%BE%D0%B3.pdf> (дата обращения 29.03.22).
  - Цецёв А.Т., Карпенко Ю.Н. Разработка условий ВЭЖХ для оценки качества нового биологически активного соединения с цитотоксической активностью / Всероссийская научно-практическая онлайн-конференция с международным участием «Фармацевтическое образование СамГМУ. История, современность, перспективы», посвященная 50-летию фармацевтического образования СамГМУ (Самара, 26–27 октября 2021 г.). Сборник материалов. – Самара: ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2021. – С. 185–190.

## UV SPECTROPHOTOMETRY IN THE ANALYSIS OF A NEW DERIVATIVE 2-AMINOPYRROLE WITH ANTI-TUMOR ACTIVITY

A.T. Tsechiyev<sup>1</sup>, Ju.N. Karpenko<sup>1,2</sup>, N.M. Igidov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russia

<sup>2</sup> Parma Clinical LLC, Perm, Russia

The features of the absorption of a new biologically active compound 2-amino-1-(4-bromophenyl)-5-(3,3-dimethyl-2-oxobutylidene)-4-oxo-4,5-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (2-ABFPC) in the UV range

*of the spectrum were studied. The influences of the pH and the solvent on the nature of the electronic spectrum of the compound were established. A spectrophotometric method for the quantitative determination of 2-ABFPC in a substance using a standard sample has been developed and validated. The proposed method, within the limits of the analytical area, corresponds to the officinal acceptance criteria in terms of specificity, linearity, accuracy and precision.*

**Keywords:** anticancer drugs, 2-aminopyrrole derivatives, quality assessment, UV spectrophotometry, validation