

Будова і властивості

УДК 615.074:543.42:543.632.562

Жук Ю. М., Васюк С. О., Антипенко Л. М.
Запорізький державний медичний університет

Вивчення будови продукту взаємодії бісопрололу з тимоловим синім

На попередньому етапі цього дослідження було розроблено спектрофотометричну методику кількісного визначення бісопрололу фумарату з тимоловим синім у середовищі хлороформу з утворенням забарвленого продукту реакції з максимумом світлопоглинання за 420 нм. У результаті роботи було визначено, що бісопролол взаємодіє з тимоловим синім у стехіометричних співвідношеннях 1:1. Виділений продукт реакції між бісопрололу фумаратом та тимоловим синім було вивчено за допомогою ІЧ- та ¹H ЯМР-спектроскопії. Ідентифікацію та доведення індивідуальності вихідних сполук та продукту реакції проведено хромато-мас-спектрометрично. Доведено, що продуктом реакції між зазначеною лікарською речовиною та відповідним сульфоталеїновим барвником є іонний асоціат.

Ключові слова: бісопролол, тимоловий синій, продукт взаємодії, ІЧ-спектроскопія, ¹H ЯМР-спектроскопія, хромато-мас-спектроскопія.

Сульфоталеїнові барвники вже майже сторіччя добре відомі у хімічному аналізі та використовуються як рН-індикатори завдяки здатності змінювати забарвлення залежно від кислотності розчину. Також ця група барвників широко застосовується як кольорореагенти у спектрофотометрії [1, 2].

У літературі описано багато спектрофотометричних методик кількісного визначення бісопрололу фумарату з різними реагентами [3–9], зокрема й з сульфоталеїновими барвниками [10–11]. Водночас встановлено, що залежно від умов перебігу реакцій утворюються продукти різного складу [3, 11].

Нами було розроблено методику кількісного визначення бісопрололу фумарату в складі лікарських форм на основі його взаємодії з сульфоталеїновим барвником, а саме тимоловим синім (ТС), у середовищі хлороформу [12]. Тому на наступному етапі роботи важливо було встановити, яка сполука утворюється під час взаємодії зазначеного бета-адреноблокатора з тимоловим синім.

Отже, метою роботи стало виділення та ідентифікація продукту взаємодії бісопрололу фумарату з тимоловим синім. Для реалізації цієї мети було поставлено такі задачі:

- встановити стехіометричні коефіцієнти взаємодії бісопрололу фумарату з тимоловим синім;
- виділити продукт взаємодії бісопрололу фумарату з тимоловим синім;
- встановити будову продукту взаємодії бісопрололу фумарату з тимоловим синім.

Матеріали і методи дослідження

Об'єктом дослідження став робочий стандартний зразок (РСЗ) бісопрололу фумарату (Unichem, серія FP/90855).

У роботі було використано реактиви і розчинники: тимоловий синій (кваліфікації чда), хлороформ (кваліфікації чда), гексан (кваліфікації чда).

Загальні методи дослідження:

- стехіометричні коефіцієнти реагуючих речовин встановлювали методом насичення (методом молярних співвідношень) та методом неперервних змін (методом ізомолярних серій);
- ІЧ-спектри знімали на спектрофотометрі Bruker Alpha (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germany) в області 7500–400 см⁻¹ з використанням приставки ATR (пряме уведення речовини);
- ¹H ЯМР-спектри отримували на спектрофотометрі ядерного магнітного резонансу Varian-Mercury 400 (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) (400 МГц), розчинник — DMSO-d₆, внутрішній стандарт — тетраметилсилан;
- хромато-мас-спектри отримували на високоефективному рідинному хроматографі Agilent 1200 Series (Agilent, Palo Alto, CA, USA), оснащеному діодно-матричним та мас-селективним детектором Agilent LC/MSD SL. Спосіб іонізації — хімічна іонізація за атмосферного тиску (APCI). Режим іонізації — одночасне сканування позитивних та негативних іонів у діапазоні мас 80–1000 м/з. Колонка — Zorbax SB-C18 1.8 μm 4.6 × 15 mm Rapid Resolution cartridge (PN 821975-932). Рухомі фази: А — ацетонітрил, 0.1% мурашина кислота; В — вода (0.1% мурашина кислота);
- спектри поглинання забарвлених продуктів реакцій у видимій області спектра отримували на спектрофотометрі Specord 200 (Німеччина) (190–1100 нм). Одержані спектри обробляли, застосовуючи програмний пакет WinASPECT 2.2.1.0.

Результати досліджень та їх обговорення

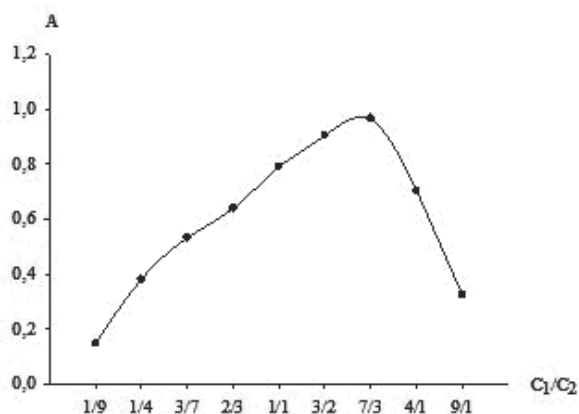
Визначення стехіометричних коефіцієнтів реагуючих компонентів у реакції між бісопрололу фумаратом та тимоловим синім

Для встановлення стехіометричних коефіцієнтів реагуючих компонентів у реакції між бісопрололу фумаратом та тимоловим синім були використані найбільш поширені методи: метод неперервних змін (метод ізомолярних серій) та метод насичення (метод молярних співвідношень).

Метод неперервних змін ґрунтується на визначенні співвідношень ізомолярних концентрацій реагуючих речовин, що відповідає максимальному виходу сполук, які утворюються в результаті реакції. Для виконання аналізу готували розчини реагенту та досліджуваної лікарської речовини однакової молярної концентрації (0.002 М) та змішували їх в антибатних співвідношеннях, проте загальний об'єм розчину залишався незмінним.

Реакцію проводили згідно з розробленою методикою [12]. Вимірювання абсорбції отриманих розчинів проводили за обраною аналітичною довжиною хвилі. За отриманими даними було побудовано графік залежності величини оптичної густини від співвідношення об'ємів компонентів ізомолярних серій (Рис. 1).

Рисунок 1

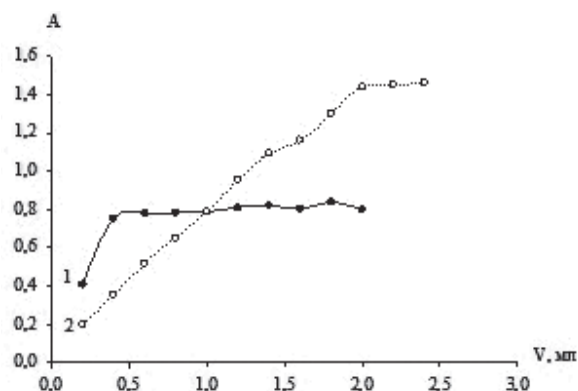


Графік залежності оптичної густини від складу ізомолярного розчину (C_1 — 0.002 М розчин ТС, C_2 — 0.002 М розчин бісопрололу фумарату) за 420 нм

В основі методу молярних співвідношень лежить встановлення залежності оптичної густини від концентрації одного з компонентів реакційної суміші за постійної концентрації другого компонента і навпаки. Точка перегину на кривій насичення відповідає відношенню концентрацій реагуючих сполук та дорівнює сте-

хіометричному коефіцієнту компонента, концентрація якого змінювалася (Рис. 2).

Рисунок 2



Криві насичення: 1 — бісопрололу фумарату за постійної концентрації ТС (1.00 мл 0.002 М розчину); 2 — ТС за постійної концентрації бісопрололу фумарату (1.00 мл 0.002 М розчину)

Як видно з Рис. 1 та 2, бісопрололу фумарат взаємодіє з ТС у співвідношенні 1:2, але зважаючи на те, що до складу молекули бісопрололу фумарату входить два катіона бісопрололу, продукт реакції містить монокатіон бісопрололу та моноаніон ТС. Отже, бісопролол взаємодіє з ТС у співвідношенні 1:1.

Виділення продукту взаємодії бісопрололу фумарату з тимоловим синім.

Відповідно до встановлених стехіометричних коефіцієнтів компонентів реакції було виділено забарвлений продукт взаємодії бісопрололу фумарату з тимоловим синім.

Загальна методика виділення продукту реакції: 76.69 мг (0.0001 моль) бісопрололу фумарату розчиняли у 5.00 мл хлороформу, додавали розчин 95.12 мг (0.0002 моль) ТС у 5.00 мл хлороформу, перемішували та залишали на 30 хв за кімнатної температури. До суміші додавали *n*-гексан до помутніння та залишали для викристалізації на 24 год. Осад відфільтровували крізь паперовий фільтр «синя стрічка», промивали декілька разів *n*-гексаном та сушили за кімнатної температури. Виділений продукт реакції являє собою цегляно-червоні кристали, розчинні у хлороформі, метанолі, етанолі, ацетоні та ДМСО, мало розчинні у воді, нерозчинні у *n*-гексані. Вихід одержаної сполуки становить 147.31 мг (85.74 %).

Ідентифікація продукту взаємодії бісопрололу фумарату з тимоловим синім.

Для підтвердження того, що продуктом реакції між бісопрололу фумаратом та тимоловим синім є іонний асоціат, було проведено

Рисунок 3

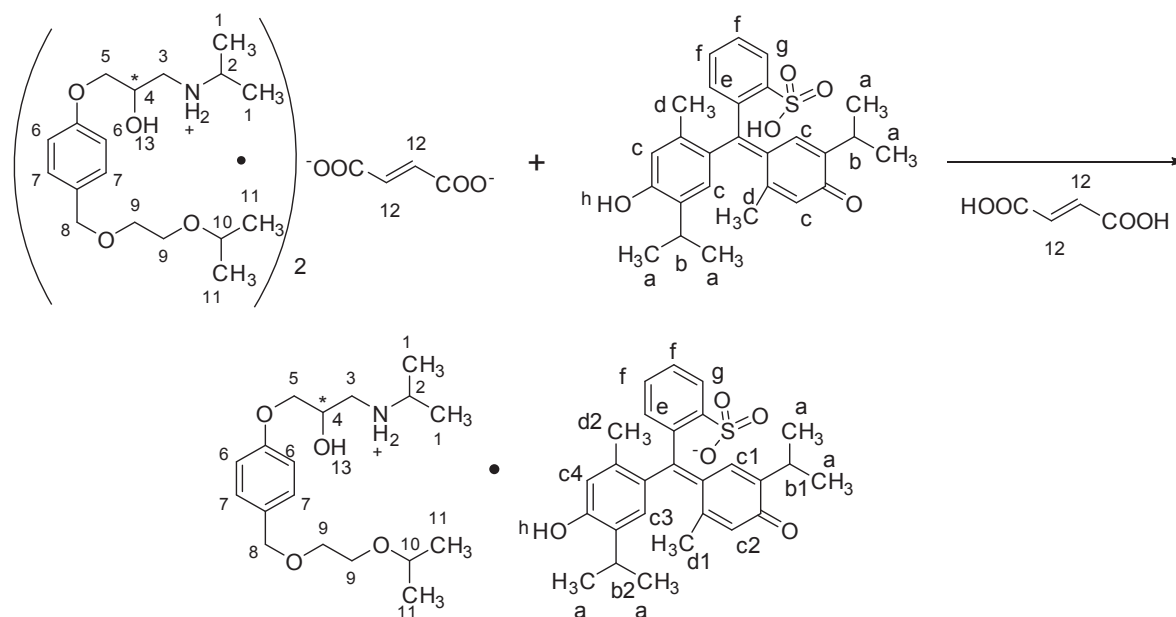


Схема взаємодії бісопрололу фумарату з тимоловим синім

ІЧ-спектрометричне дослідження бісопрололу фумарату, тимолового синього та продукту їх взаємодії (Рис. 3).

Вихідні сполуки та іонний асоціат характеризуються наявністю усіх відповідних валентних та деформаційних коливань згідно із запропонованими структурами (Табл. 1).

Так, у ІЧ-спектрі продукту реакції спостерігається гіпсохромний зсув сигналу карбонільної, сульфо-, ефірної груп та метильних замісників. Протонування вторинної амінової групи бісопрололу підтверджується валентними коливаннями, що фіксуються за 2746 та 1574 cm^{-1} . Набуває малої інтенсивності та уширюється сигнал валентного коливання ОН-групи, а валентні коливання ароматичних кілець набувають незначного батохромного зсуву. Що стосується деформаційних коливань СН-, СО-, CN-

та CS-зв'язків, то вони присутні з відповідною інтенсивністю в області 1300 – 600 cm^{-1} .

Для ідентифікації та доведення індивідуальності вихідних сполук та вивчення продукту реакції було хромато-мас-спектрометрично досліджено бісопрололу фумарат і ТС, а також утворений ними продукт реакції, за умови розчинення досліджуваної речовини та реагенту у співвідношенні 1:1 у середовищі хлороформу для сприяння формуванню та послабленню іонізації утвореного іонного асоціату.

Одержані хроматограми доводять, що чистота вихідних сполук становить 100 %. На хроматограмі продукту реакції бісопрололу фумарат – тимоловий синій у середовищі хлороформу реєструвалися два піки у співвідношенні один до чотирьох, а саме m/z 325 бісопрололу (22 %) на m/z 466 (78 %) тимолового синього, з часом

Таблиця 1

Характеристичні смуги та тип коливань у ІЧ-спектрах досліджуваних сполук, cm^{-1}

Група	Бісопролол		Тимоловий синій		Продукт	
-ОН	3114	x	3054	x	3247	—
-COO ⁻	1609	x _{as}	—	—	1603	x _{as}
	1334	x _s	—	—	1335	x _s
-C-O-C	1082	x	—	—	1077	x
-C=O	—	—	1746	x	1621	x
-SO ₃ H/-SO ₃ ⁻	—	—	1240	x _{as}	1231	x _{as}
	—	—	1083	x _s	1082	x _s
-NH ₂ ⁺	2717	x	—	—	2746	x
	1566	Δ	—	—	1574	Δ
-C(CH ₃) ₂	1366	Δ	1378	Δ	1343	Δ
Ar кільце	1565	x	1555	x	1574	x

виходу, що відповідає вихідним сполукам. Враховуючи, що субстанція є фумаратом, реакція протонування тимоловим синім проходить як за аміногрупою бісопрололу, так і двома карбоксильними залишками фумарової кислоти, тобто з однією молекулою основи бісопрололу реагує одна молекула реагенту у співвідношенні 1:1.

Крім того, нещодавнє дослідження A.D. Rapinante *et al.* про взаємодію бісопрололу фумарату з бромкрезоловим зеленим також показав

ло співвідношення бісопрололу основи та реагенту як 1:1 [11].

Для однозначного доведення утворення іонного асоціату було знято ¹H ЯМР-спектри для бісопрололу фумарату та продукту реакції між бісопрололу фумаратом та ТС. Для кращої інтерпретації результатів ¹H ЯМР-спектрів на Рис. 3 усі протони бісопрололу та тимолового синього було пронумеровано цифрою та буквою відповідно, сигнали та розщеплення яких відповідали запропонованим структурам та даним літератури.

Таблиця 2

Хімічні зсуви у ¹H ЯМР-спектрах досліджуваних сполук, м.ч.

Бісопролол		Тимоловий синій		Продукт	
Хімічний зсув, м.ч., кількість H, мультипл., J, Гц	Номер атома	Хімічний зсув, м.ч., кількість H, мультипл., J, Гц	Номер атома	Хімічний зсув, м.ч., кількість H, мультипл., J, Гц	Номер атома
—	—	—	—	0.83 (3H), c	d2
—	—	0.98 (12H), ΔΔ, J = 18.6; 6.8 Гц	a	0.98, 0.94 (12H), ΔΔ, J = 16.8; 6.7 Гц	a
1.09, (12H), Δ, J = 6.1 Гц	11	—	—	1.10 (12H), Δ, J = 6.1 Гц	11
1.15 (12H), ΔΔ, J = 16.6; 4.4 Гц	1	—	—	1.25, 1.57 (12H), ΔΔ, J = 16.6; 4.4 Гц	1
—	—	1.91 (6H), c	d	2.07 (3H), Δ, J = 13.0 Гц	d1
2.77, 2.92 (4H), ΔΔ, J = 11.4; 7.1 Гц	3	—	—	2.98 – 2.95 (4H), м	3
3.09 – 3.05 (2H), м	2	3.04 (2H), гепт., J = 6.8 Гц	b	3.08 – 3.06 (4H), м	2, b
3.48 (8H), c	9	—	—	3.49 (8H), c	9
3.61 – 3.51 (2H), м	10	—	—	3.55 (2H), гепт. J = 6.0 Гц	10
3.90 (4H), ΔΔ, J = 12.4; 7.1 Гц	5	—	—	3.95 (4H), ΔΔ, J = 9.6; 5.3 Гц	5
4.06 – 4.02 (2H), м	4	—	—	4.15 – 4.10 (2H), м	4
4.39 (4H), c	8	—	—	4.41 (4H), c	8
—	—	—	—	5.94 (2H), ΔС	12
6.42 (2H), c	12	—	—	—	—
—	—	—	—	6.56 – 6.52 (2H), м, уш.	13
—	—	6.61 (4H), c	c	6.63 (1H), c	c4
—	—	—	—	6.78 – 6.75 (3H), м	c1 – 3
6.88 (4H), Δ, J = 8.5 Гц	6	—	—	6.90 (4H), Δ, J = 8.4 Гц	6
—	—	7.06 (1H), ΔΔ, J = 5.6; 3.0 Гц	e	7.07 – 7.02 (1H), м, уш.	e
7.21 (4H), Δ, J = 8.4 Гц	7	—	—	7.23 (4H), Δ, J = 8.2 Гц	7
—	—	7.70-7.65 (2H), м	f	7.39 – 7.35 (1H), м, уш.; 7.64 (1H), Δ, J = 6.8 Гц	f
—	—	7.97 (1H), ΔΔ, J = 5.6; 3.1 Гц	g	7.94 – 7.90 (1H), м	g
—	—	—	—	8.23 (1H), c	ОН h
—	—	—	—	9.17 (1H), c	COOH

¹H ЯМР-спектри досліджуваних сполук та отриманого продукту реакції довели їх будову згідно з хімічними зсувами сигналів протонів та їх відповідною мультиплетністю (Табл. 2). Внаслідок наявності великої кількості ароматичних протонів як у бісопрололу, так і у тимолового синього, що значною мірою ускладнює інтерпретацію спектрів продуктів реакції, було проаналізовано дані літератури для однозначного віднесення того чи іншого сигналу до відповідного протона [13].

¹H ЯМР-спектр бісопрололу фумарату характеризується наявністю подвійної кількості усіх протонів, через присутність рацемічної суміші його двох енантіомерів (Рис. 3), що також підтверджується даними літератури [13]. Крім того, його обмінні протони ОН- та NH-груп не спостерігались через дейтерообмін з ДМСО-*d*₆.

Основними маркерами утворення іонних асоціатів є хімічні зсуви сигналів 3–5 протонів бісопрололу, на які впливає протонування аліфатичної компоненти молекули субстанції кислим протоном сульфогрупи тимолового синього.

Більшість ароматичних фенільних протонів бісопрололу внаслідок утворення іонної пари фіксуються як нерозщеплені мультиплети. Деякі сигнали еквівалентних метильних протонів, навпаки, зазнають розщеплення.

Висновки

У результаті роботи було встановлено, що бісопрололу фумарат взаємодіє з тимоловим синім у співвідношенні 1:1, а також виділено та встановлено будову продукту взаємодії бісопрололу фумарату з тимоловим синім. За допомогою ІЧ- та ¹H ЯМР-спектроскопії підтверджено, що продуктом реакції є іонний асоціат.

ЛІТЕРАТУРА

- Prashanth K.N. Rapid and Sensitive Spectrophotometric Measurement of Non-Specific Beta Blocker Propranolol Hydrochloride Using Three Sulphonphthalein Dyes In Pure Form, Pharmaceuticals and Human Urine / Prashanth K.N., Basavaiah K., Raghu M.S. // Chemical Sciences Journal. — 2012. — Vol. CSJ-80. — <http://astonjournals.com/csj>.
- Tripti Sharma. Extractive Spectrophotometric Determination of Nebivolol Hydrochloride in Pharmaceutical Formulation and Biological Fluids / Tripti Sharma, Dannana Gowrisankar, Sudam Chandra Si // Int. J. PharmTech Res. — 2014. — Vol. 6, № 5. — P. 1571-1579.
- Ulu S.T. Spectrophotometric determination of bisoprolol in pharmaceutical preparations by charge transfer reactions / S.T. Ulu, E. Kel // Optics and Spectroscopy. — 2012. — Vol. 112, № 6. — P. 864-867.
- Spectrofluorimetric and Spectrophotometric Determination of Irbesartan and Bisoprolol hemifumarate independently in their Tablets / Afaf A. Abdelmonem, Gamal H. Ragab, Hisham A. Hashem, Eman A. Bahgat // UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences. — 2016. — Vol. 4, № 2. — P. 43-52.
- Пат. на корисну модель 67203 Україна, МПК G01N 21/78. Спосіб кількісного визначення бісопрололу фумарату в та-

блетках / Тарханова О.О., Шара Є.О., Васюк С.О. — № u2011 08150; заявл. 29.06.11; опубл. 10.02.12, Бюл. № 3.

6. A novel spectrophotometric determination of atenolol using sodium nitroprusside / Nadia Bashir, S W H Shah, Masroor Bangesh, Riazullah // Journal of Scientific & Industrial Research. — 2011. — Vol. 70. — P. 51-54.

7. Gudruman A.D. Spectrophotometric determination of bisoprolol using methyl orange as reagent / Gudruman A.D., Murarasu A., Dorneanu V. // Farmacia. — 2012. — Vol. 60, № 5. — P. 634-641.

8. Utility of complexation reaction for the determination of some cardiovascular drugs / Ayad M., Abdellatef H., Hosny M., Sharaf Y. // Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. — 2013. — Vol. 6, № 1. — P. 92-102.

9. Spectrophotometric method for estimation of bisoprolol fumarate in tablets / Panainte A.D., Bibire N., Tvbntaru G. [et al.] // Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi. — 2014. — Vol. 118, № 2. — P. 558-563.

10. Akram M. El-didamony. Extraction-spectrophotometric determination of some antihypertensive drugs in pharmaceutical and biological fluids using two sulphonphthalein dyes / Akram M. El-didamony, Sameh M. Hafeez, Ahmed A. Saad // International Journal of Applied Farmaceutics. — 2015. — Vol. 7, № 1. — P. 10-17.

11. A new method for the assay of bisoprolol using bromcresol green / Panainte A.D., Bibire N., Tvbntaru G. [et al.] // Rev. Chim. — 2014. — Vol. 65, № 8. — P. 916-920.

12. Жук Ю.М. Спектрофотометричне визначення бісопрололу за реакцією з тимоловим синім / Жук Ю.М., Васюк С.О., Кейтлін І.М. // Запорізький медичний журнал. — 2012. — Вип. 72. — № 3. — С. 62-64.

13. Zielinska-Pisklak M.A. ¹H and ¹³C NMR characteristics of β -blockers / Zielinska-Pisklak M.A., Pisklak D.M., IwonaWawer // Magnetic Resonance Chemistry. — 2011. — № 49. — P. 284-290.

УДК 615.074:543.42:543.632.562

Резюме

Жук Ю. Н., Васюк С. А., Антипенко Л. Н. Запорожский государственный медицинский университет

Изучение строения продукта взаимодействия биопролола с тимоловым синим

На предварительном этапе данного исследования была разработана спектрофотометрическая методика количественного определения биопролола фумарата с тимоловым синим в среде хлороформа с образованием окрашенного продукта с максимумом поглощения при 420 нм. В результате работы было определено, что биопролол реагирует с тимоловым синим в стехиометрических соотношениях 1:1. Выделенный продукт реакции между биопрололом фумаратом и тимоловым синим был изучен с помощью ИК- и ¹H ЯМР-спектроскопии. Идентификация и доказательство индивидуальности исходных веществ и продукта реакции проведены хромато-масс-спектрометрически. Доказано, что продуктом реакции между указанным лекарственным веществом и соответствующим сульфоталеиновым красителем является ионный ассоциат.

Ключевые слова: биопролол, тимоловый синий, продукт взаимодействия, ИК-спектроскопия, ¹H ЯМР-спектроскопия, хромато-масс-спектрометрия.

UDC 615.074:543.42:543.632.562

Summary

Zhuk Y. M., Vasyuk S. O., Antipenko L. M. Zaporizhzhya State Medical University

Research of the structure of bisoprolol with thymol blue interaction product

Preliminary to the study, the spectrophotometric procedure for the quantitative determination of bisoprolol fumar-

ate with thymol blue in chloroform, with the formation of a coloured product with the maximum absorbance wavelength at the 420 nm in the concentration ranges of 2.5-3.75 mg/100ml of bisoprolol, was developed. In the presented study, the stoichiometric coefficients of bisoprolol fumarate and thymol blue were determined by the isomolar series and molar ratio methods. It was determined that bisoprolol interacts with thymol blue in the stoichiometric ratio of 1:1. The product of the interaction was isolated in pure form, in the form of brick-red crystals. The study of the solubility has shown that it is slightly soluble in water, insoluble in *n*-hexane, soluble in chloroform, methanol, ethanol, acetone, and DMSO. The identification and purity of starting compounds as well as the product of their interaction were studied using LC-MS, IR and ¹H NMR spectroscopy. The purity of the starting compounds was shown to be 100 %. It was found that the product of the reaction between bisoprolol fumarate and the corresponding sulfonphthalein dye was an ionic associate.

Keywords: bisoprolol, thymol blue, interaction product, IR-spectroscopy, ¹H NMR-spectroscopy, chromatography-mass spectroscopy.

Жук Юлія Миколаївна. Асистент кафедри аналітичної хімії Запорізького державного медичного університету, к. фарм. н.

Васюк Світлана Олександрівна. Завідувач кафедри аналітичної хімії Запорізького державного медичного університету, д. фарм. н., професор.

Антипенко Людмила Миколаївна. Post Doc, Department of Applied Sciences, Hochschule Neubrandenburg Germany, PhD of Pharmacy.