

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

А.И.Жебентяев, Е.С.Гуринова

М-ФЕНИЛЕНДИАМИН КАК РЕАГЕНТ - АЗОСОСТАВЛЯЮЩАЯ ДЛЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОКАИНА

Витебский государственный
медицинский университет

Исследован новый реагент как азосоставляющая для спектрофотометрического определения прокаина. Процедура определения основывается на диазотировании прокаина и последующем азосочетании с м-фенилендиамином в водном растворе. Определены оптимальные условия образования окрашенного продукта (рН = 2,4–3,1; время азосочетания 30 мин). Установлена оптимальная концентрация реагента – азосоставляющей (м-фенилендиамина), соответствующая максимальному выходу азокрасителя ($4 \cdot 10^{-5}$ моль/л). Изучены химико-аналитические характеристики образующегося азосоединения: длина волны $\lambda_{\max} = 450-460$ нм, кажущийся молярный коэффициент поглощения $\epsilon_{\max} = 4,25 \cdot 10^4$. В области концентраций прокаина 0,16–5,10 мкг/мл растворы, содержащие азокраситель, подчиняются основному закону светопоглощения. Стехиометрическое соотношение реагирующих компонентов в реакции азосочетания определено методами спектрофотометрического анализа - молярных отношений (насыщения), прямой линии (Асмуса). Результаты указывают, что диазотированный прокаин и м-фенилендиамин образуют азосоединение в соотношении 1:1. На основании полученных результатов и, учитывая литературные данные по состоянию реагирующих веществ в условиях образования окрашенного продукта, обсуждено наиболее вероятное строение образующегося азосоединения. Уравнение прямой, соответствующей прямолинейному участку градуировочного графика, имеет вид $A = 0,157x$.

ВВЕДЕНИЕ

Фотометрические определения лекарственных соединений - первичных ароматических аминов, основанные на реакции диазотирования и последующем азосочетании, характеризуются высокой чувствительностью. Одно из лекарственных веществ, в структуре которого присутствует первичная ароматическая аминогруппа - прокаин, используемый как местноанестезирующее средство. Для определения подлинности первичных ароматических аминов ГФ-ХІ рекомендует реакцию диазотирования с последующим азосочетанием с β -нафтолом [1]. Для количественного определения прокаина согласно ГФ-Х используют метод нитритометрии, основанный на реакции диазотирования с внутренними индикаторами нейтральным красным или тропеолином 00 в смеси с метиленовым синим [2]. Известны методики фотометрических определений прокаина как диазосоставляющей по реакции предварительного диазотирования и азосочетания с фенолами: тимолом, 8-оксихинолином и ароматическими аминами: 1-нафтиламином, N-(1-нафтил) этилендиамином, нафтионовой кислотой [3], характеризующиеся достаточно высокой чувствительностью. Так, молярный коэффициент поглощения продукта азосочетания с α -нафтолом $\epsilon_{\max} = 25000$, с β -нафтолом $\epsilon_{\max} = 21800$, с N-(1-нафтил)этилендиамином $\epsilon_{\max} = 27000$ для диазотированной сульфаниловой кислоты [4].

Положение максимума (λ_{\max}) в спектре азосоединения и величина молярного коэффициента поглощения зависят от строения азосоставляющей. Согласно теории цветности [5], одним из способов углубления цвета (увеличения ϵ_{\max}) и чувствительности определения является увеличение электронодонорности заместителей и количества электронодонорных заместителей в м-положении друг к другу, в котором возможно их согласованное влияние на смещение электронов в сопряженной сис-

теме в сторону электроноакцепторного заместителя в остатке прокаина (диазосоставляющей). С другой стороны, реакция азосочетания протекает по механизму электрофильного замещения в ароматическом ядре. При этом согласованное влияние ЭД заместителей в м-положении друг к другу повышает активность азосоставляющей как ароматического субстрата в реакции азосочетания с диазосоставляющей электрофильным реагентом. Поэтому выход азосоединения и скорость реакции азосочетания увеличиваются.

Перечисленным условиям удовлетворяет строение 3-аминофенола и м-фенилендиамина. Разработаны чувствительные методики определения нимесулида после предварительного восстановления нитрогруппы и ряда сульфаниламидов, таких как дапсон (диафенилсульфон), сульфатазол (норсульфазол), сульфадиазин (сульфазин), сульфациламид, сульфаметоксазол, сульфамеразин, сульфагуанидин (сульгин), сульфадимидин (сульфадимезин) по реакции диазотирования и последующего азосочетания с 3-аминофенолом [6,7]. М-фенилендиамин используют как активную, азосоставляющую для получения азокрасителей для окрашивания тканей [5]. Описана методика фотометрического определения м-фенилендиамина в анилине по реакции с диазотированным анилином ($\lambda_{\max} = 460$ нм) [3]. Разработана методика титриметрического определения ароматических аминов, в том числе м-фенилендиамина, по реакции их азосочетания с хлоридами п-толуол- и м-нитробензолдиазония [4]. В работе [8] изучено диагностическое средство, относящееся к группе азокрасителей и по химическому строению представляющее 2,4-диамино-4'-этоксизобензол. Данное соединение может быть получено с использованием м-фенилендиамина как азосоставляющей по реакции азосочетания. Предельная чувствительность поглощения его растворов составляет 0,5мкг/мл (рН = 2) и 0,5-1 мкг/мл (рН = 8). Однако использование м-фенилендиамина как азосоставляющей – реагента для фотометрического определения лекарственных веществ с

первичной ароматической аминогруппой в изученной литературе не описано.

Целью настоящей работы является определение оптимальных условий образования и выхода окрашенного продукта в реакции азосочетания диазотированного прокаина с м-фенилендиамином и изучение его основных химико-аналитических свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали прокаин фармакопейной чистоты, м-фенилендиамин сернокислый квалификации х.ч. Для исследований готовили их водные растворы нужной концентрации. Для перевода прокаина в диазосоединение использовали 2 М НСl и 0,1% раствор NaNO_2 . Избыток азотистой кислоты удаляли 4 М раствором мочевины. Диазотирование и азосочетание проводили при комнатной температуре в мерных колбах вместимостью 25 мл. Нужное значение рН среды для исследования влияния кислотности на выход азосоединения создавали 0,1 М NaOH.

Оптическую плотность окрашенных растворов азосоединений измеряли с помощью спектрофотометра СФ-46 в кюветках с толщиной поглощающего слоя 1 см относительно воды очищенной. Значения рН растворов контролировали с помощью иономера лабораторного И-160, в качестве индикаторного использовали стеклянный электрод.

Стехиометрическое соотношение компонентов в реакции азосочетания диазотированного прокаина и м-фенилендиамина определяли методами насыщения, прямой линии (Асмуса) [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спектр поглощения продукта реакции азосочетания диазотированного прокаина и м-фенилендиамина имеет максимум при 450-460 нм (рис. 1).

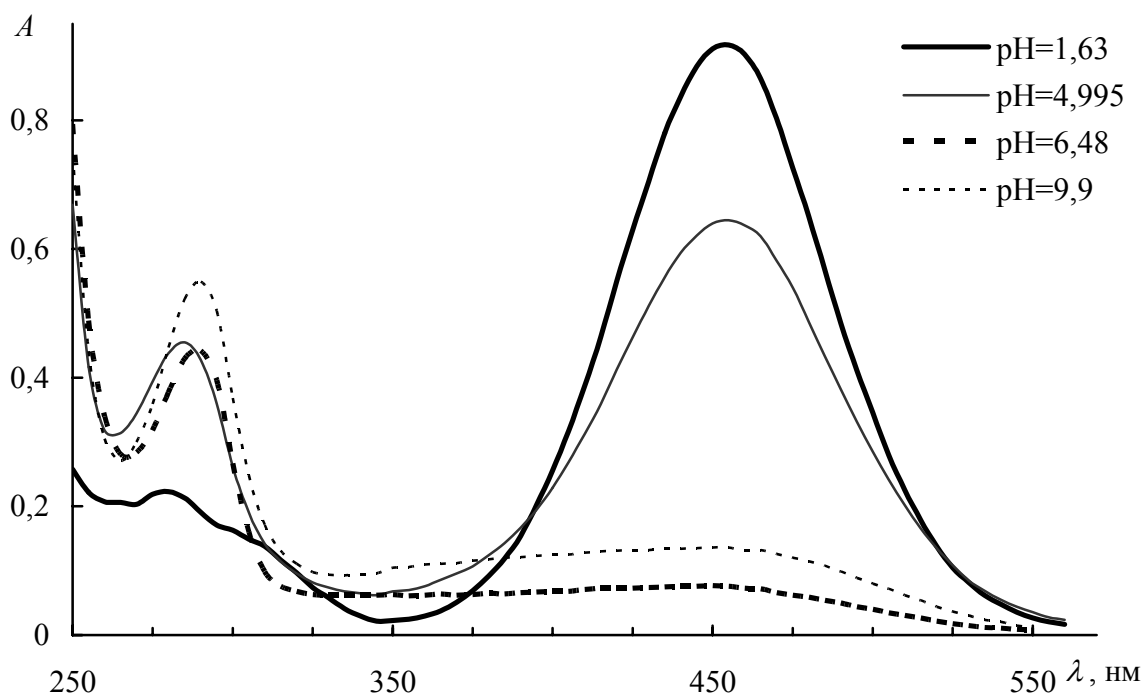


Рис. 1. Спектр поглощения раствора азокрасителя
 $C_{\text{прокаина}}=0,02 \cdot 10^{-3}$ моль/л; $C_{\text{м-фенилендиамина}}=0,2 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

На скорость достижения максимального значения оптической плотности раствора и выход образуемого азосоединения оказывает влияние рН среды. На рис. 2 приведена зависимость оптической плотности растворов продукта реакции азосо-

четания диазотированного прокаина с м-фенилендиаминном сульфатом от рН, а на рис. 3,4 – от времени выполнения реакции азосочетания при разных значениях рН от 1,65 до 2,61.

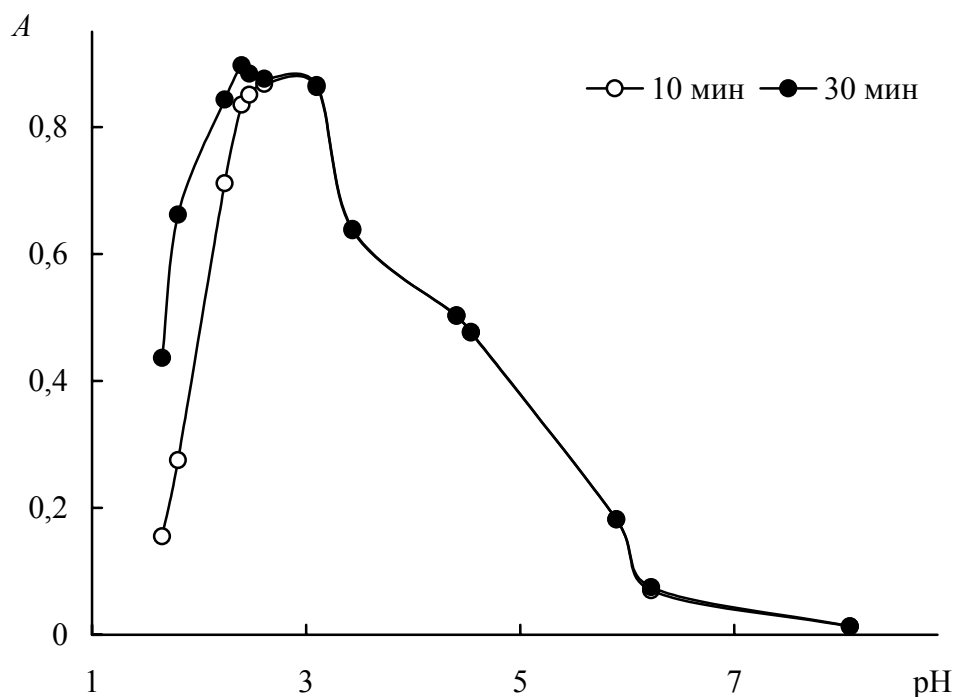


Рис. 2. Зависимость оптической плотности растворов, содержащих прокаин и м-фенилендиамин, от рН
 $\lambda_{\text{max}}=460$ нм; $C_{\text{прокаина}}=0,02 \cdot 10^{-3}$ моль/л; $C_{\text{м-фенилендиамина}}=0,2 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

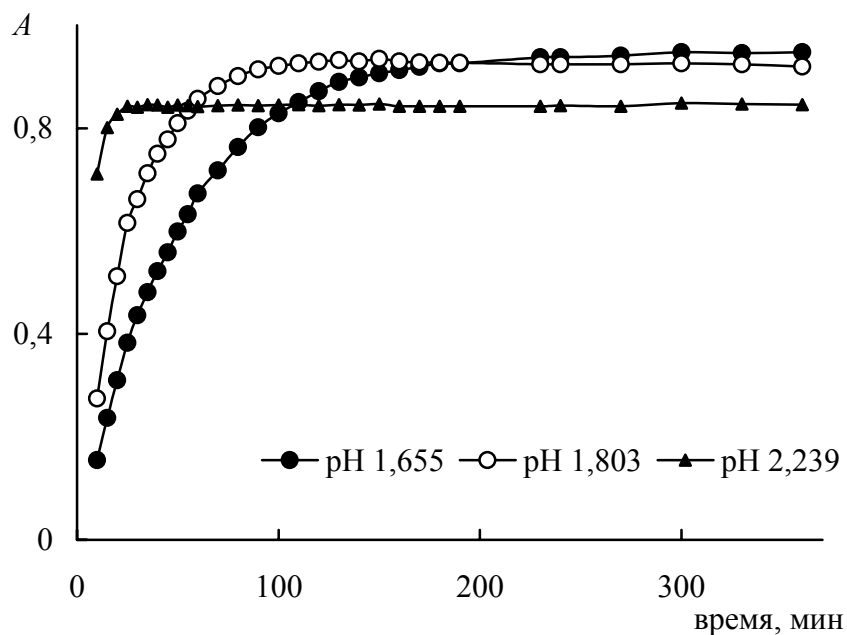


Рис. 3. Реакция диазотированного прокаина с м-фенилендиамина сульфатом $\lambda_{\max}=460$ нм; $C_{\text{прокаина}}=0,02 \cdot 10^{-3}$ моль/л; $C_{\text{м-фенилендиамина}}=0,2 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

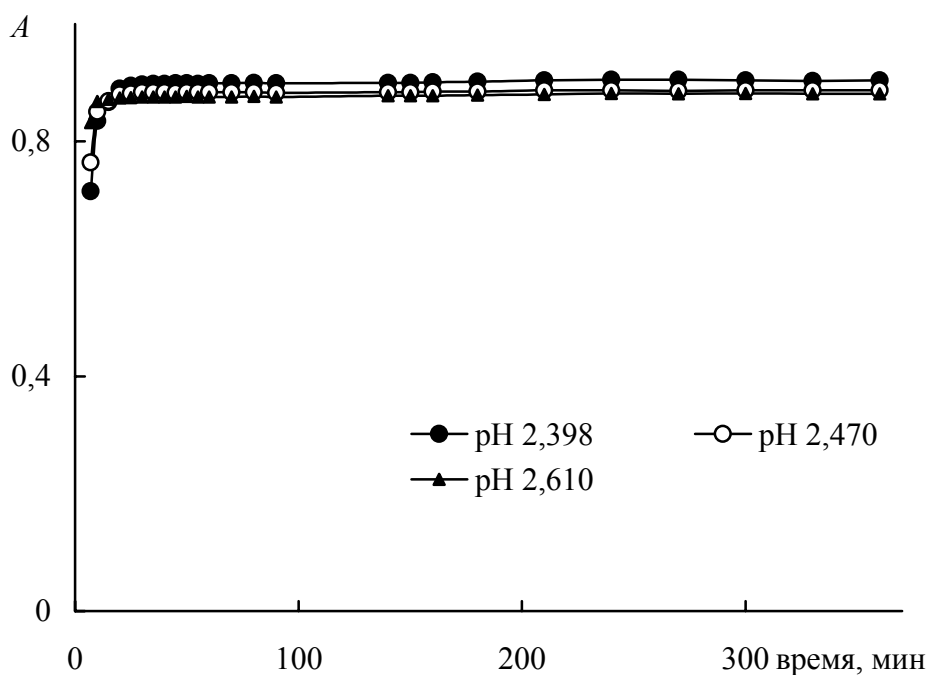


Рис. 4. Реакция диазотированного прокаина с м-фенилендиамина сульфатом $\lambda_{\max}=460$ нм; $C_{\text{прокаина}}=0,02 \cdot 10^{-3}$ моль/л; $C_{\text{м-фенилендиамина}}=0,2 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

Оптимальное значение рН составляет 2,24-3,1. В этом диапазоне оптическая плотность максимальна через 30 минут после начала стадии азосочетания и через 10 минут – при рН 2,4-3,1. При снижении рН замедляется скорость азосочетания и оптическая плотность достигает максималь-

ного значения через 4 часа при рН 1,66 ($A_{\max} = 0,940$), и через 2 часа при рН = 1,8 ($A_{\max} = 0,930$) (рис. 3). При повышении рН до близкой к нейтральной (рН=5; 6,5) и далее щелочной среды (рН=9,9; 10,5) уменьшается интенсивность максимума при 450-460 нм, соответствующего азосое-

динению, и увеличивается интенсивность максимума при 280-290 нм, соответствующего исходному прокаину (в соответствии с данными [10] $\lambda_{\text{max}} = 279$ нм для прокаина в водном растворе) (рис. 1). Таким образом, при повышении pH уменьшается выход окрашенного продукта реакции азосочетания.

Влияние pH на скорость и выход продукта реакции азосочетания можно объяснить следующим образом. В качестве азосоставляющей использовали раствор м-фенилендиамина сульфата, в котором м-фенилендиамин находился в форме катиона аммония. Нужно значение pH создавали нейтрализацией солянокислого раствора 0,1 М раствором NaOH. При достижении pH, близкой к нейтральной и щелочной, часть щелочи расходовалась на превращение катионной формы м-фенилендиамина в свободное основание. В итоговом растворе устанавливалось равновесие, во-первых, между протонированной формой м-фенилендиамина и формой сво-

бодного амина и, во-вторых, между формами диазотированного прокаина – катионном диазония и диазотат-анионом. При понижении pH до 1,8 и 1,66 снижается скорость реакции азосочетания, так как увеличивается превращение реакционноспособной формы свободного амина в не реакционноспособный протонированный аммониевый катион ($pK_{\text{BH}^+} = 4,98$ для м-фенилендиамина). При повышении pH выше 3,1 выход окрашенного продукта снижается, так как уменьшается концентрация реакционноспособной формы диазотированного прокаина–катиона диазония, который в сильнощелочной среде полностью превращается в не реакционноспособный диазотат-анион [11].

Стехиометрическое соотношение диазотированного прокаина и м-фенилендиамина, определенное по методу насыщения (рис. 5,6) и методу прямой линии (Асмуса), составило 1:1.

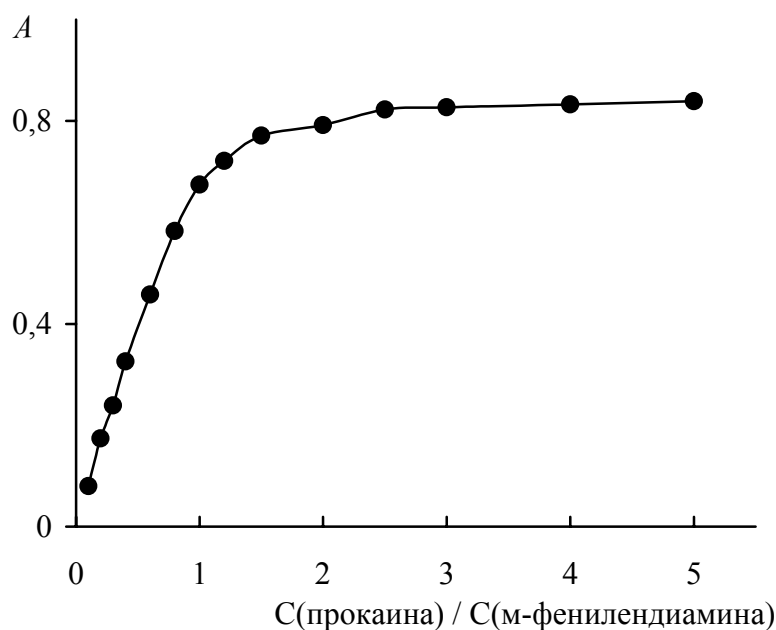


Рис. 5. Кривая насыщения в реакции диазотированного прокаина с м-фенилендиамина сульфатом $\lambda_{\text{max}}=460$ нм; $C_{\text{м-фенилендиамина}}=0,02 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

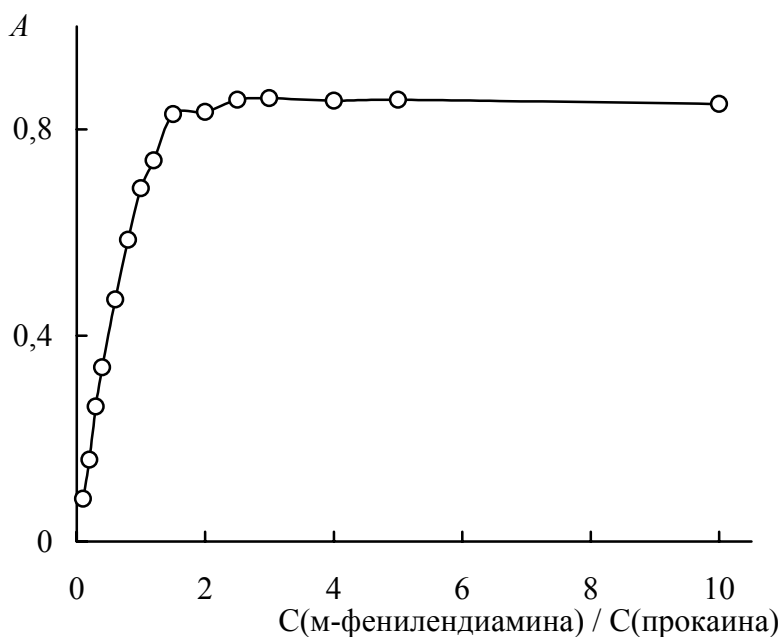
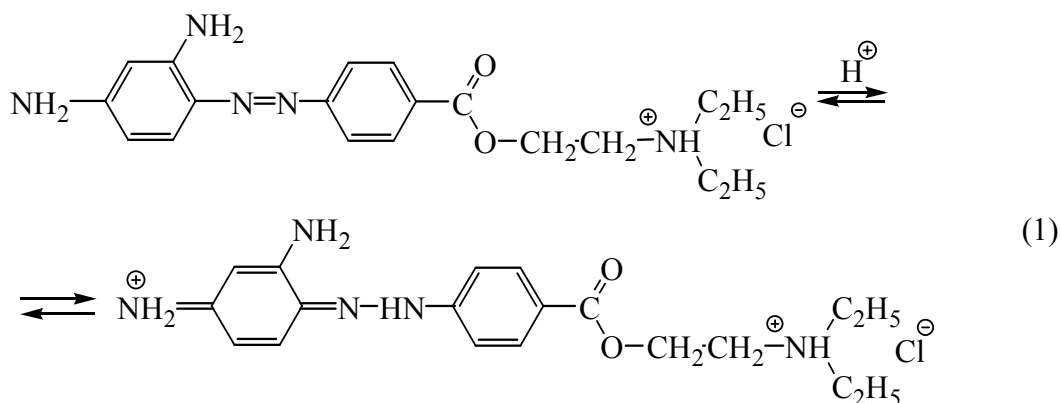


Рис. 6. Кривая насыщения в реакции диазотированного прокаина с м-фенилендиамина сульфатом $\lambda_{\max}=460$ нм; $C_{\text{прокаина}}=0,02 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

На основании полученных экспериментальных данных можно предположить

строение продукта реакции азосочетания (1):



В кислой среде возможно образование протонированной формы азосоединения.

Величину кажущегося молярного коэффициента светопоглощения рассчитывали как угловой коэффициент прямой зависимости светопоглощения растворов азосоединения от молярной концентрации прокаина при достаточном избытке реагента ($\epsilon_{\max} = 4,25 \cdot 10^4$).

Определена оптимальная концентрация азосоставляющей м-

фенилендиамина сульфата в растворе $4 \cdot 10^{-5}$ моль/л, соответствующая максимальному выходу азокрасителя. При исследовании зависимости оптической плотности раствора азосоединения от концентрации прокаина (рис. 7) и установлено, что растворы азосоединения подчиняются основному закону светопоглощения в пределах концентраций прокаина 0,16 – 5,10 мкг/мл.

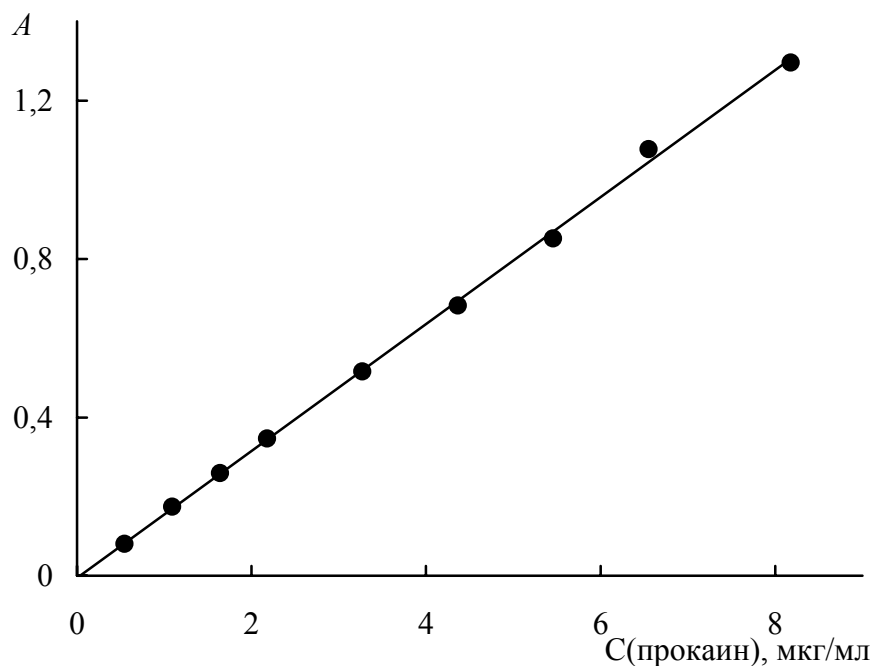


Рис. 7. Градуировочный график; $C_{\text{м-фенилендиамина}} = 0,04 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

По методу наименьших квадратов выполнена математическая обработка градуировочного графика. Уравнение прямой, соответствующей прямолинейному участку градуировочного графика, имеет вид $A = 0,157x$.

ВЫВОДЫ

1. Исследован м-фенилендиамин как реагент (азосоставляющая) для спектрофотометрического определения прокаина по реакции диазотирования с последующим азосочетанием.

2. Определены оптимальные условия выполнения и спектральные характеристики продукта реакции азосочетания диазотированного прокаина с м-фенилендиаминсульфатом (pH=2,4-3,1; $\lambda_{\text{max}} = 450-460$ нм; $\epsilon = 4,25 \cdot 10^4$).

SUMMARY

A.I. Zhebentyaev, A.S. Hurynava.
1,3-PHENYLENEDIAMINE AS A
COUPLING AGENT FOR THE
SPECTROPHOTOMETRIC

DETERMINATION OF PROCAINE.

Novel coupling reagent for the spectrophotometric determination of procaine hydrochloride was examined. The procedure of deter-

mination is based on the diazotization of procaine HCl, followed by coupling with 1,3-phenylenediamine in aqueous medium. The optimal conditions of the colored azo product formation were defined. They are pH = 2,4 – 3,1; the time of diazo coupling is 30 min. The optimal concentration of coupling reagent (1,3-phenylenediamine), corresponding to a maximum yield of azo dye, was established; it is $4 \cdot 10^{-5}$ mol/l. The main chemico-analytical properties of received azo compound were studied. They are wavelength (λ_{max}) of 450-460 нм, apparent molar absorptivity (ϵ_{max}) of $4,25 \cdot 10^4$ in a maximum absorption. Beer's law for azo dye containing solutions is obeyed in the concentration range of 0,16 – 5,10 μg/ml of procaine HCl. Stoichiometric ratio of reacting components in diazo coupling reaction was investigated by applying the spectrophotometric analysis methods, such as the molar ratio and straight line (Asmus). The results indicated that diazotized procaine HCl and 1,3-phenylenediamine form 1:1 azo compound. Based on the received results and taking account in the literature data of reacting substances state in conditions of colored product formation, the most plausible structure of formed azo product was discussed. The equation of a straight line, corresponding

to a straight part of the calibration curve, is $A = 0,157x$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея СССР. 11-е изд.: в 2 выпусках / Э.А. Бабаян, М.Д. Машковский [и др.]. – М.: Медицина, 1987-1990. Вып. 1: Общие методы анализа / Э.А. Бабаян [и др.] – 1987. – 333 с.
2. Государственная фармакопея СССР. 10-е изд. / М.Д. Машковский (гл. ред.) [и др.] - М.: Медицина, 1968. – 1079 с.
3. Коренман, И.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. / И.М.Коренман. – 2-е изд., пер. и доп.– М.: Химия, 1975.– 350 с.
4. Сиггия, С. Количественный органический анализ по функциональным группам / С. Сиггия, Дж. Г. Хана. - М.: Химия, 1983. – 671 с.
5. Степанов, Б.И. Введение в химию и технологию органических красителей: Учеб.для вузов / Б.И. Степанов. - 3-е изд., перераб. и доп. - М.: Химия, 1984.–592 с.
6. Nagaraja, P. 3-Aminophenol as a novel coupling agent for the spectrophotometric determination of sulfonamide derivatives / P. Nagaraja, H.S. Yathirajan, C.R. Raju, R.A. Vasantha, M.S. Hemantha Kumar // *Farmaco Societa chimica italiana*. – 2003. – Vol. 58, № 12. – P. 1295-1300.
7. Nagaraja, P. Novel coupling reagents for the sensitive spectrophotometric determination of nimesulide in pharmaceutical preparations / P. Nagaraja, H.S. Yathirajan, H.R. Arunrumar, R.A. Vasantha. // *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. – 2002. – Vol 20, 29, № 1, 2. – P. 277-282.
8. Шаповалов, В.В. Квалифицирование режима контроля и судебно-фармацевтического скрининга диагностического средства / В.В. Шаповалов, В.А. Шаповалова, Н.М. Халин [и др.] // *Сучасні проблеми токсикології*. – 2003. - № 3.
9. Булатов, М.И. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа / М.И. Булатов, И.П. Калинин. – 5-е изд., перераб.–Л: Химия, 1986. – 432 с.
10. Moffat, A.C. Clark's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals / A.C. Moffat. – Second Edition. – London: The pharmaceutical press, 1986. – P. 1684.
11. Сайкс, П. Механизмы реакций в органической химии / П. Сайкс. 4-е изд. - пер. с англ. под ред. В.Ф. Травеня. – М.: Химия, 1991. – 448 с.

Поступила 2.02.2007 г.
