



УДК 543.42:547.461.2'313.4'857.4

DOI <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2021.4.12705>

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ (7-Н-БУТИЛ-3-МЕТИЛКСАНТИН-8-ІЛ) ДІЕТИЛАМІНОЕТИЛАМОНІЙ ОКСАЛАТУ

Ю. М. Жук, Д. Г. Іванченко, С. О. Васюк

Запорізький державний медичний університет

lebed_yuliya@i.ua

ІНФОРМАЦІЯ

Надійшла до редакції / Received:
17.11.2021

Після доопрацювання / Revised:
19.11.2021

Прийнято до друку / Accepted:
22.11.2021

Ключові слова:

(7-н-бутил-3-метилксантин-8-іл)
діетиламіноетиламоній оксалат;
кількісне визначення;
УФ-спектрофотометрія;
валідація.

АНОТАЦІЯ

Мета роботи. Розробка та валідація УФ-спектрофотометричної методики кількісного визначення (7-н-бутил-3-метилксантин-8-іл) діетиламіноетиламоній оксалату.

Матеріали і методи. Об'єкт дослідження – субстанція (7-н-бутил-3-метилксантин-8-іл)діетиламіноетиламонію оксалату. Розчинник – вода очищена. Аналітичне обладнання: спектрофотометр Specord 200 (Analytic Jena AG, Німеччина), ваги лабораторні електронні RADWAG XA 210.4Y, баня ультразвукова Sonorex Digitec DT100H, мірний посуд класу А.

Результати й обговорення. Для розробки методики кількісного визначення зазначеної речовини обрано смугу, яка спостерігається при 265 – 325 нм з максимумом світлопоглинання при 296 нм. Згідно з вимогами ДФУ було розраховано прогноз повної невизначеності методики, а також проведено валідацію методики за такими валідаційними характеристиками, як діапазон застосування, лінійність, прецизійність, правильність та робастність. Діапазон застосування методики лежить у межах 75–125 %. Розраховані числові показники лінійності свідчать, що методика є лінійною в усьому діапазоні застосування методики ($r = 0,9999$). Розрахований довірчий інтервал Δ_x не перевищує максимально припустиму невизначеність аналізу Δ_{As} , що свідчить, що методика є точною на рівні збіжності. Доведено, що систематична похибка δ , яка вноситься нестабільністю аналізованого розчину, не перевищує критичного значення $max\delta$, тобто розчин залишається стабільним впродовж щонайменше 1 год.

Висновки. Розроблено та валідовано УФ-спектрофотометричну методику кількісного визначення (7-н-бутил-3-метилксантин-8-іл) діетиламіноетиламоній оксалату.

Вступ. Нові ліки, які з'являються на ринку щороку, є привілейованими структурами для певних біологічних цілей. Ці нові хімічні сполуки дають уявлення про молекулярне розпізнавання, одночасно виступаючи як основа для розробки нових ліків у майбутньому [1]. Оскільки лікарські препарати можуть мати структурну гомологію за подібними біологічними мішенями, поширена думка, що синтез нових хімічних сполук і знання

підходів до їх створення підвищать здатність ефективніше відкривати нові ліки. Хімічна модифікація, фармацевтичний скринінг, драг-дизайн – основні підходи у створенні нових лікарських засобів. Завдяки хімічній модифікації постійно пропонується велика кількість біологічно активних сполук – перспективних ліків [2–4].

З огляду на те, що для створення нових фізіологічно активних сполук для хімічної модифікації часто

обирається добре вивчена природна молекула, наш вибір зупинився на ксантиновому ядрі. Тим більше, на основі ксантину вже створена велика кількість препаратів, які використовуються в сучасній медичній практиці, а роботи з розробки синтезу нових 1,3,7,8-заміщених ксантину тривають.

Так, експерименти з вивчення біологічних властивостей похідних ксантину, які у своїй структурі містять триазольний цикл, показали перспективність використання останніх як протитуберкульозних, протиzapальних, актопротекторних засобів [5, 6].

Наразі у створенні нових ліків активно використовуються драг-дизайн, який має на меті пошук молекул, що взаємодітимуть з тим чи іншим рецептором. Встановлено, що численна кількість ксантинів є інгібіторами аденозинових та пуринергічних рецепторів [7]. Проявом інгібування A2-рецепторів є анагетична, антиастматична, нейролептична, імуномодулююча активності [8]. Показана перспектива використання проп-2-інільованих C8-арил або гетероарилксантинів як антагоністів A2B аденозинових рецепторів [9].

З огляду на вищенаведене, можна резюмувати, що цілеспрямований синтез біологічно активних сполук та створення на їх основі нових високоефективних та малотоксичних лікарських засобів, які б могли конкурувати з дорогими імпорними препаратами, є трендом сучасної фармацевтичної науки.

Продовжуючи роботу професора Романенка М. І. з пошуку біологічно активних сполук серед заміщених ксантину, була розроблена методика синтезу (7-н-бутил-3-метилксантин-8-іл)діетиламіноетиламонію оксалату та вивчена його біологічна дія. За результатами первинного фармакологічного скринінгу отримана сіль за показниками протизапальної та анагетичної активності значно перевершує еталонні препарати (диклофенак та анальгін).

Однак поруч із вивченням біологічної активності важливим є хіміко-аналітичне дослідження новосинтезованих сполук. Спектрофотометрія в УФ-області спектра широко використовується в аналізі зазначених речовин як чутливий, простий у виконанні та експресний метод [10]. Тому метою роботи стала розробка методів кількісного визначення (7-н-бутил-3-метилксантин-8-іл)діетиламіноетиламонію оксалату в субстанції, а також валідація розробленої методики, згідно з вимогами ДФУ [11].

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження стала субстанція (7-н-бутил-3-метилксантин-8-іл)діетиламіноетиламонію оксалату. Як розчинник було використано воду очищену.

Аналітичне обладнання: спектрофотометр Specord 200 (Analytic Jena AG, Німеччина), ваги лабораторні електронні RADWAG XA 210.4Y, баня ультразвукова Sonorex Digitec DT100H, мірний посуд класу А.

Дослідження проводили на кафедрі аналітичної хімії Запорізького державного медичного університету.

Методика кількісного визначення (7-н-бутил-3-метилксантин-8-іл)діетиламіноетиламонію оксалату в субстанції: точну наважку (7-н-бутил-3-метилксантин-8-іл)діетиламіноетиламонію оксалату (0,0150–0,0250 г) переносять у мірну колбу ємністю 100,00 мл, розчиняють у воді очищеній та доводять до позначки цим же розчинником, ретельно перемішують. В мірну колбу на 25,00 мл переносять 2,00 мл отриманого розчину та доводять водою очищеною до позначки, ретельно перемішують. Абсорбцію отриманих розчинів вимірюють на фоні розчинника при довжині хвилі 296 нм. Паралельно проводять визначення з 2,00 мл 0,02 % розчину порівняння (7-н-бутил-3-метилксантин-8-іл)діетиламіноетиламонію оксалату, який готують шляхом розчинення точної наважки (7-н-бутил-3-метилксантин-8-іл)діетиламіноетиламонію оксалату у воді очищеній. Вміст діючої речовини у відсотках розраховують за формулою:

$$C_{\%} = \frac{A \cdot C_0 \cdot 100,00 \cdot 25,00}{A_0 \cdot p \cdot 2,00 \cdot l}$$

де A – абсорбція розчину, що аналізується;

A_0 – абсорбція розчину порівняння;

C_0 – концентрація розчину порівняння (7-н-бутил-3-метилксантин-8-іл)діетиламіноетиламонію оксалату, що спектрофотометрується (0,0016 г у 100,00 мл);

p – наважка субстанції, г;

l – товщина поглинаючого шару, см.

Результати й обговорення. Спектр поглинання водного розчину (7-н-бутил-3-метилксантин-8-іл)діетиламіноетиламонію оксалату в УФ-області спектра характеризується декількома смугами поглинання. Для розробки методики кількісного визначення зазначеної речовини було обрано смугу, яка спостерігається при 265–325 нм з максимумом світлопоглинання при 296 нм (рис. 1).

Прогноз повної невизначеності методики

Згідно з вимогами ДФУ необхідно обов'язково проводити прогноз повної невизначеності, що виключає отримання некоректних результатів при відтворенні розробленої методики в інших лабораторіях.

Прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не повинна перевищувати максимально припустиму невизначеність результатів аналізу $\max \Delta_{AS}$. Повну прогнозовану відносну невизначеність розраховують за формулою:

$$\Delta_{AS} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2}$$

де Δ_{SP} – невизначеність пробопідготовки;

Δ_{FAO} – невизначеність кінцевої аналітичної операції.

У випадку спектрофотометрії розрахована прогнозована невизначеність кінцевої аналітичної операції

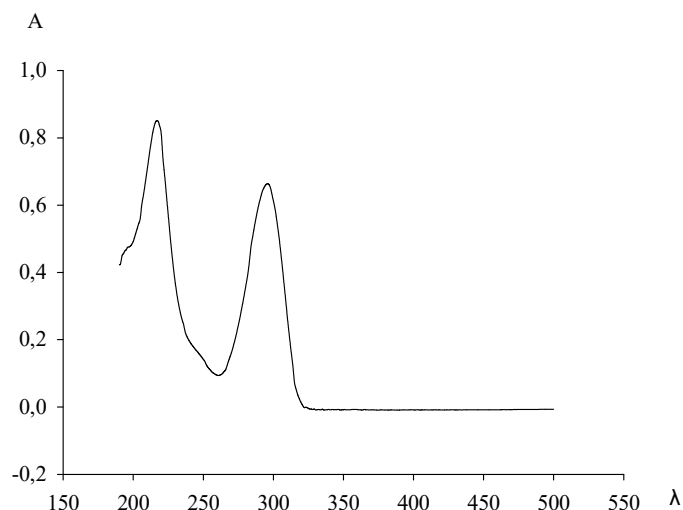


Рис. 1. УФ-спектр поглинання (7-н-бутил-3-метилксантин-8-іл)діетиламіноетиламоній оксалату у воді дистильованій.

Δ_{FAO} складає 0,70 % та характеризує ту реальну точність, яка зараз досягається у вітчизняних контрольних лабораторіях [12]. Розрахунок невизначеності пробопідготовки Δ_{SP} проводили, враховуючи вимоги ДФУ до гранично припустимих похибок для мірного посуду, вагів та приладів.

Прогнозована повна невизначеність результатів аналізу $\Delta_{AS} = 1,07\%$ та не перевищує критичного значення $max\Delta_{AS} = 1,5\%$, тобто результати, отримані за даною методикою, будуть коректними при виконанні її й в інших лабораторіях.

Валідацію розробленої методики кількісного визначення (7-н-бутил-3-метилксантин-8-іл)діетиламіноетиламоній оксалату проводили, враховуючи ви-

моги ДФУ, за такими валідаційними характеристиками, як лінійність, прецизійність, правильність та робастність.

Лінійність та діапазон застосування

Лінійну залежність вивчали у межах діапазону застосування методики (75–125 %) шляхом розведення стандартного розчину. За отриманими даними будували графік сигналу як функції концентрації досліджуваної лікарської речовини та візуально оцінювали його лінійність (рис. 2).

Отримані результати переводили в нормалізовані координати, обробляли методом найменших квадратів та розраховували рівняння лінійної регресії $y = bx + a$. Розраховані показники (табл. 1) свідчать про те, що

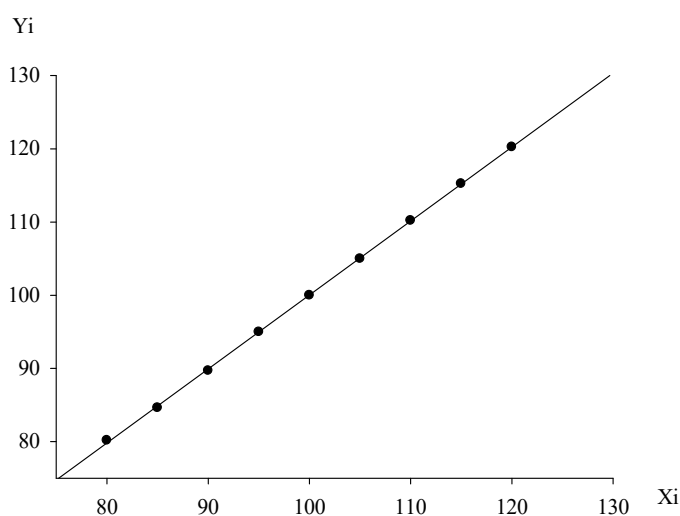


Рис. 2. Графік залежності абсорбції від концентрації (7-н-бутил-3-метилксантин-8-іл)діетиламіноетиламоній оксалату в нормалізованих координатах.

Таблиця 1

Числові показники лінійної залежності

Величина	Значення	Критерії	Висновок
$b \pm (s_b)$	1,005±(0,003085)	–	–
$a \pm (s_a)$	-0,4867±(0,3111)	$ a \leq \Delta a = t(95\%;7) \cdot s_a = 0,5879$	відповідає
$s_{x_0}(\%)$	0,09943	$\leq \Delta_{As}(\%) / t(95\%;7) = 0,7917$	« »
r	0,9999	$\geq 0,9983$	« »

методика є лінійною в усьому діапазоні застосування, а також виконуються усі вимоги щодо параметрів лінійної залежності.

Точність та правильність

Точність розробленої методики кількісного визначення (7-н-бутил-3-метилксантин-8-іл)діетиламіноетиламоній оксалату проводили на рівні збіжності. Для цього проводили дев'ять паралельних визначень (три концентрації/три повтори). Паралельно вимірювали абсорбцію 0,02 % стандартного розчину (7-н-бутил-3-метилксантин-8-іл)діетиламіноетиламоній оксалату.

Враховуючи вимоги ДФУ щодо представлення результатів, було розраховано метрологічні характеристики: середнє (\bar{X}), стандартне відхилення (S), від-

носне стандартне відхилення (RSD) та довірчий інтервал одиничного (Δ_x) значення (табл. 2).

Розрахований довірчий інтервал Δ_x не перевищує максимально припустиму невизначеність аналізу Δ_{As} , що свідчить про те, що методика є точною на рівні збіжності.

Робасність

Одним з елементів дослідження робасності аналітичної методики є вивчення стабільності дослідного розчину. Зазвичай треба довести, що систематична похибка δ , що вноситься його нестабільністю, не перевищує критичного значення $max\delta$ (табл. 3).

За даними таблиці 3, $\Delta t \leq max\delta$, тобто дослідний розчин та розчин порівняння стабільні не менше 1 год.

Таблиця 2

Визначення правильності та прецизійності кількісного визначення (7-н-бутил-3-метилксантин-8-іл) діетиламіноетиламоній оксалату в субстанції

Лікарська речовина	Метрологічні характеристики				
	$\bar{X}(n=9)$	S	RSD %	Δ_x	Δ_{As}
(7-н-бутил-3-метилксантин-8-іл) діетиламіноетиламоній оксалату	99,93	0,206	0,206	0,383	1,5

Таблиця 3

Стабільність аналізованих розчинів у часі

Абсорбція розчину	t, хв					Середнє	RSD _r %	Δ_t %	max δ %
	0	15	30	45	60				
A	0,6512	0,6511	0,6518	0,6523	0,6524	0,6518	0,0924	0,197	0,480

Висновки. За результатами роботи було розроблено спектрофотометричну методику кількісного визначення (7-н-бутил-3-метилксантин-8-іл)діетиламіноетиламоній оксалату в субстанції, а також доведено, що за такими валідаційними характеристиками, як лінійність, діапазон застосування, прецизійність,

правильність та робасність розроблена методика валідна.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interests: authors have no conflicts of interests to declare.

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF (7-N-BUTYL-3-METHYLXANTHIN-8-YL) DIETHYLAMINOETHYLAMMONIUM OXALATE

Y. M. Zhuk, D. H. Ivanchenko, S. O. Vasyuk

Zaporizhzhia State Medical University

lebed_yuliya@i.ua

The aim of the work. Development and validation of UV spectrophotometric method for the quantitative determination of (7-n-butyl-3-methylxanthin-8-yl) diethylaminoethylammonium oxalate.

Materials and Methods. The object of study is a substance of (7-n-butyl-3-methylxanthin-8-yl)diethylaminoethylammonium oxalate. The solvent – purified water. Analytical equipment: Specord 200 spectrophotometer (Analytic Jena AG, Germany), electronic laboratory scales (RADWAG XA 210.4Y), the ultrasonic bath (Sonorex Digitec DT100H), measuring utensils (Class A).

Results and Discussion. The band observed at 265–325 nm with a maximum of light absorption at 296 nm was selected to develop the method for the quantitative determination of this substance. According to the requirements of the SPU, the forecast of complete uncertainty of the methodology was calculated, as well as the validation of the methodology according to such validation characteristics as range of application, linearity, precision, accuracy and robustness. The range of application of the technique is in the range of 75–125 %. The calculated numerical values of linear dependence indicate that the method is linear in the whole range of application methods ($r = 0.9999$). The calculated confidence interval Δx does not exceed the maximum allowable uncertainty of the analysis ΔA_s , which indicates that the method is accurate at the level of convergence. It is proved that the systematic error δ , which is introduced by the instability of the analyzed solution, does not exceed the critical value of $\max \delta$, ie the solution remains stable for at least 1 hour.

Conclusion. The UV spectrophotometric method for the quantitative determination of (7-n-butyl-3-methylxanthin-8-yl) diethylaminoethylammonium oxalate has been developed and validated.

Key words: (7-n-butyl-3-methylxanthin-8-yl)diethylaminoethylammonium oxalate; quantitative determination; UV spectrophotometry; validation.

Перелік бібліографічних посилань

1. Synthetic approaches to new drugs approved during 2018. A. C. Flick, C. A. Leverett, H. X. Ding et al. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2020. Vol. 63, No 19. P. 10652–10704.
2. Kaplaushenko T. M., Panasenko O. I., Kucheryavy Y. M. Research of the synthetic, physical and chemical properties of 3-alkylsulfonyl-5-(Chinoline-2-yl, 2-hydroxychinoline-4-yl)-4-r1-2,4-dihydro-3n-1,2,4-triazoles. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2017. Vol. 10, No 1. P. 81–83.
3. O. A. Bihdan, V. V. Parchenko. Chemical modification and physicochemical properties of new derivatives 5-(thiophen-3-ilmethyl)-4-r1-1,2,4-triazole-3-thiol. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2021. Vol. 14, No 9. P. 4621–4629.
4. Pyrrolo[1,2-a]azolo-(azino-)[c]quinazolines and their derivatives as 15-LOX inhibitors: Design, in vitro studies and QSAR-analysis. *Journal of research in pharmacy*. N. Krasovska, V. Stavytskyi, I. Nosulenko et. al. 2021. Vol. 25, No 5. P. 540–548.
5. A. S. Gotsulia, V. V. Zazharskyi, P. O. Davydenko. Synthesis and antituberculosis activity of N'-(2-(5-(theophylline-7'-yl)methyl)-4-R-4H-1,2,4-triazole-3-ylthio)acetyl)isonicotinohydra-zides. *Запорізький медичний журнал*. 2018. Vol. 4, No 109. P. 578–583.
6. Gotsulya A. S. Actoprotective properties of 7'-((3-thio-4-methyl-4H-1,2,4-triazole-5-yl)methyl)theophylline derivatives. *Запорізький медичний журнал*. 2016. Vol. 3, No 96. P. 104–107.
7. Exploring the structural determinants of novel xanthine derivatives as A2B adenosine receptor antagonists: a computational study. Yinfeng Yang, Yan Li, Weiwei Zhou et al. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2019. Vol. 37, No 13. P. 3467–3481.
8. S. Basu, D. A. Barawkar, V. Ramdas. A2B adenosine receptor antagonists: Design, synthesis and biological evaluation of novel xanthine derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017. Vol. 127. P. 986–996.
9. S. Basu, D. A. Barawkar, V. Ramdas. Design and synthesis of novel xanthine derivatives as potent and selective A2B adenosine receptor antagonists for the treatment of chronic inflammatory airway diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017. Vol. 134. P. 218–229.
10. Спектрофотометричне визначення оригінальної субстанції Хінабут і таблетованої лікарської форми на її основі. Воскобойнік О. Ю., Мєдведєва К. П., Коваленко С. І. та ін. *Запорізький медичний журнал*. 2016. Т. 1. № 94. С. 72–76.
11. Державна Фармакопея України. 1-е вид. Харків : Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. 620 с.
12. Гризодуб А. И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества

лекарственных средств. Харьков : Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный

центр качества лекарственных средств», 2016. 396 с.

References

1. Flick A, Leverett C, Ding H, McInturff E, Fink S, Helal C. Synthetic approaches to new drugs approved during 2018. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2020;63(19): 10652-704.
2. Tm K, Oi P, Yu K. Research of the synthetic, physical and chemical properties of 3-alkylsulfonyl-5-(Chinoline-2-yl, 2-hydroxychinoline-4-yl)-4-r1-2,4-dihydro-3n-1,2,4-triazoles. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2016;10(1): 81.
3. Bihdan O, Parchenko V. Chemical modification and Physicochemical properties of new derivatives 5-(thiophen-3-ilmethyl)-4-R1-1,2,4-triazole-3-thiol. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2021;14(9): 4621-9.
4. Krasovska N, Stavtyskyi V, Nosulenko I, Kholodniak S, Antypenko O, Voskoboinik O et al. Pyrrol[1,2-a]azolo-(azino-)[c]quinazolines and their derivatives as 15-LOX inhibitors: Design, in vitro studies and QSAR-analysis. *Journal of Research in Pharmacy*. 2021;25(5): 540-548.
5. Gotsulya A, Zazharskyi V, Davydenko P. Synthesis and antituberculosis activity of N'-(2-(5-((theophylline-7'-yl)methyl)-4-R-4H-1,2,4-triazole-3-ylthio)acetyl)isonicotinohydrazides. *Zaporozhye Medical Journal*. 2018;4(109): 578-83.
6. Gotsulya A. Actoprotective properties of 7'-((3-thio-4-methyl-4H-1,2,4-triazole-5-yl)methyl)theophylline derivatives. *Zaporozhye Medical Journal*. 2016;(96) : 104-107.
7. Yang Y, Li Y, Zhou W, Chen Y, Wu Q, Pan Y et al. Exploring the structural determinants of novel xanthine derivatives as A2B adenosine receptor antagonists: a computational study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2018;37(13): 3467-81.
8. Basu S, Barawkar D, Ramdas V, Waman Y, Patel M, Panmand A et al. A 2B adenosine receptor antagonists: Design, synthesis and biological evaluation of novel xanthine derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017;127: 986-96.
9. Basu S, Barawkar D, Ramdas V, Patel M, Waman Y, Panmand A et al. Design and synthesis of novel xanthine derivatives as potent and selective A 2B adenosine receptor antagonists for the treatment of chronic inflammatory airway diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017;134: 218-29.
10. Voskoboinik OYu, Miedviedieva KP, Kovalenko SI Eds. [Spectrophotometric determination of the original substance Hinabut and tablet dosage form based on it]. *Zaporizk med zhurn*. 2016;1(94): 72-6. Ukrainian.
11. State Pharmacopoeia of Ukraine. [Державна Фармакопея України] Kharkiv: Derzhavne pidpriemstvo «Naukovo-ekspertnyi tsentr»; 2008. Ukrainian.
12. Standardized procedures for validating quality control methods for medicines. [Стандартизованые процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств]. Kharkiv: Gosudarstvennoe predpriyatie «Ukr nauchn farmakop tsentr kachestva lekarst sredstv»; 2016. Russian.

Відомості про авторів

Жук Ю. М. – канд. фармацевт. наук, ст. викл. кафедри аналітичної хімії, Запорізький державний медичний університет, Запоріжжя, Україна. E-mail: lebed_yuliya@i.uamailto:elenamaletka@gmail.com, ORCID 0000-0003-0153-5739

Іванченко Д. Г. – д. фармацевт. наук, доцент кафедри біологічної хімії, Запорізький державний медичний університет, Запоріжжя, Україна. E-mail: ivanchenko230181@gmail.com, ORCID 0000-0001-9858-2659

Васюк С. О. – д. фармацевт. наук, професор, завідувач кафедри аналітичної хімії, Запорізький державний медичний університет, Запоріжжя, Україна. E-mail: vasjuk@zsmu.zp.ua, ORCID 0000-0002-1569-9374

Information about the authors

Zhuk Y. M. – PhD (Pharmacy), Senior Lecturer of Analytical Chemistry Department, Zaporizhzhia State Medical University, Zaporizhzhia, Ukraine. E-mail: lebed_yuliya@i.uamailto:elenamaletka@gmail.com, ORCID 0000-0003-0153-5739

Ivanchenko D. H. – DSc (Pharmacy), assistant professor of Biochemistry Department, Zaporizhzhia State Medical University, Zaporizhzhia, Ukraine. E-mail: ivanchenko230181@gmail.com, ORCID 0000-0001-9858-2659

Vasyuk S. O. – DSc (Pharmacy), Professor, Head of Analytical Chemistry Department, Zaporizhzhia State Medical University, Zaporizhzhia, Ukraine. E-mail: vasjuk@zsmu.zp.ua, ORCID 0000-0002-1569-9374