



DOI <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2024.1.14518>

УДК 543.42:547.857.4'572.3/6

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ 1-БЕНЗИЛ-8-МОРФОЛІНОТЕОБРОМІНУ

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

Запорізький державний медико-фармацевтичний університет

lebed_yuliya@i.ua

ІНФОРМАЦІЯ

Надійшла до редакції / Received:
02.02.2024

Після доопрацювання / Revised:
07.03.2024

Прийнято до друку / Accepted:
08.03.2024

Ключові слова:

1-бензил-8-морфолінотеобромін;
кількісне визначення;
УФ-спектрофотометрія;
валідація, AGREE.

АНОТАЦІЯ

Мета роботи. Розробка методики кількісного визначення 1-бензил-8-морфолінотеоброміну в субстанції та її валідація відповідно до вимог Державної Фармакопеї України (ДФУ).

Матеріали і методи. Матеріал дослідження – субстанція 1-бензил-8-морфолінотеоброміну. Розчинник – метанол. Аналітичне обладнання: спектрофотометр Specord 200 (Analytic Jena AG, Німеччина), ваги лабораторні електронні RADWAG XA 210.4Y, баня ультразвукова Sonorex Digitec DT100H, мірний лабораторний посуд класу А.

Результати й обговорення. Для розробки методики кількісного визначення зазначеної речовини обрано смугу в абсорбційному електронному спектрі у діапазоні 260–320 нм за довжини хвилі 292 нм. Валідацію методики було проведено згідно з вимогами ДФУ за такими характеристиками, як діапазон застосування, лінійність, прецизійність, правильність та робастність, розраховано прогнозовану повну невизначеність методики. Діапазон її застосування лежить у межах 61–139 %. Розраховані параметри свідчать про лінійність методики у дослідженому діапазоні застосування. Розрахований однобічний довірчий інтервал не перевищує максимально допустиму невизначеність аналізу, що свідчить про точність методики на рівні збіжності. Методика є правильною, оскільки систематична похибка статистично не відрізняється від нуля, тобто істинне значення величини не виходить за межі встановленого довірчого інтервалу. Аналізовані розчини стабільні протягом щонайменше 60 хв, оскільки систематична похибка, яка вноситься нестабільністю аналізованих розчинів, не перевищує критичного значення.

Висновки. У роботі розроблено просту, експресну та безпечну для навколишнього середовища спектрофотометричну методику кількісного визначення 1-бензил-8-морфолінотеоброміну в субстанції. Доведено, що за характеристиками: лінійність, діапазон застосування, прецизійність, правильність та робастність розроблена методика є валідною.

Вступ. З моменту відкриття у 1817 р. Емілем Фішером і до теперішнього часу вчені вивчають вплив ксантинових алкалоїдів на організм людини та можливі шляхи їх структурної модифікації. За більше ніж 200 років було розроблено низку лікарських препаратів на основі похідних ксантину, які активно використовують у сучасній медичній практиці як стимулятори цен-

тральної нервової системи (ЦНС), гіпотензивні, діуретичні, бронхолітичні засоби [1]. За даними літератури, похідні ксантину виявляють різноманітні біологічні ефекти, серед яких бронхолітична, протівірусна, протипухлинна, протимікробна, антиоксидантна дії [4–8].

Технічний прогрес дозволив розкрити механізми виникнення різноманітних патологій (атеросклероз,

цукровий діабет, ішемічна хвороба серця та ін.), що змушує шукати нові підходи їх лікування [2, 3].

Продовжуючи дослідження з пошуку біологічно активних сполук серед похідних ксантину, яке розпочав професор М. І. Романенко, було розроблено методику синтезу 1-бензил-8-морфоліноатеоброміну та вивчено його біологічну дію. За результатами первинного фармакологічного скринінгу отримана сполука за показником діуретичної дії не поступається гідрохлортиазиду [9].

Вивчення біологічної активності новосинтезованих сполук тісно пов'язано з необхідністю контролю за якістю й визначенням вмісту, а отже, з наявністю методик кількісного визначення. Спектрофотометрію, як метод аналізу, широко застосовують у сучасних хімічних дослідженнях, оскільки вона характеризується доступністю, експресністю та простотою виконання при витримуванні належної точності та чутливості, що дозволяє використовувати її для кількісного аналізу речовин. Особливо стали застосовувати пряму спектрофотометрію в УФ-спектрі [10].

Мета роботи. Розробка спектрофотометричної методики кількісного визначення 1-бензил-8-морфоліноатеоброміну в субстанції та її валідація відповідно до вимог Державної Фармакопеї України (ДФУ).

Матеріали і методи. Матеріал дослідження – субстанція 1-бензил-8-морфоліноатеоброміну. Розчинник – метанол. Аналітичне обладнання: спектрофотометр Sperecord 200 (Analytic Jena AG, Німеччина), ваги лабораторні електронні RADWAG XA 210.4Y, баня ультразвукова Sonorex Digitec DT100H, мірний лабораторний посуд класу А.

Дослідження проводили на кафедрах аналітичної хімії та біохімії Запорізького державного медико-фармацевтичного університету.

Методика кількісного визначення 1-бензил-8-морфоліноатеоброміну в субстанції: точну наважку

1-бензил-8-морфоліноатеоброміну (0,0140–0,0300 г) переносять у мірну колбу місткістю 100,00 мл, розчиняють у метанолі та доводять до позначки цим же розчинником, ретельно перемішують. У мірну колбу ємністю 10,00 мл переносять 1,00 мл отриманого розчину та доводять метанолом до позначки і перемішують. Абсорбцію отриманих розчинів вимірюють на тлі розчинника за довжини хвилі 292 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм.

Для приготування розчину порівняння точну наважку 1-бензил-8-морфоліноатеоброміну (0,0200 г) переносять у мірну колбу ємністю 100,00 мл, розчиняють у метанолі та доводять до позначки цим же розчинником, ретельно перемішують. У мірну колбу місткістю 10,00 мл переносять 1,00 мл отриманого розчину та доводять метанолом до позначки і перемішують. Абсорбцію розчину порівняння вимірюють на тлі розчинника за довжини хвилі 292 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм.

Вміст діючої речовини у відсотках розраховують за формулою:

$$C_{\%} = \frac{A \cdot C_0 \cdot 100,0 \cdot 10,00}{A_0 \cdot p \cdot 1,00 \cdot l},$$

де: A – абсорбція розчину, що аналізується;

A_0 – абсорбція розчину порівняння;

C_0 – концентрація розчину порівняння 1-бензил-8-морфоліноатеоброміну, що спектрофотометрується (0,0020 г у 100,00 мл);

p – наважка субстанції, г;

l – товщина поглинаючого шару, см.

Результати й обговорення. В УФ-спектрі метанольного розчину 1-бензил-8-морфоліноатеоброміну спостерігаються смуги поглинання з максимумами за довжини хвиль 222 та 292 нм. Для розробки методики кількісного визначення досліджуваної речовини було обрано смугу в діапазоні 260–320 нм (рис. 1).

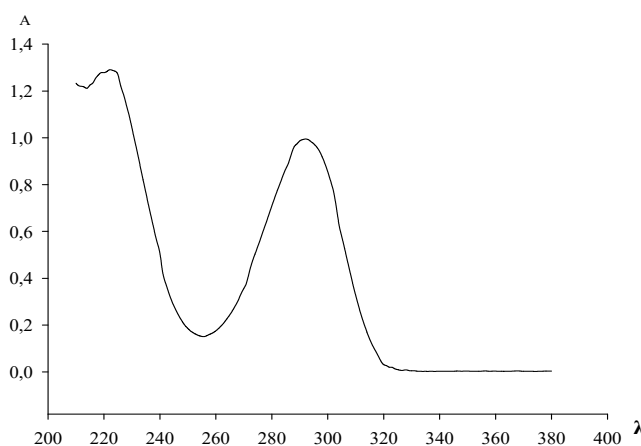


Рис. 1. Електронний спектр поглинання розчину 1-бензил-8-морфоліноатеоброміну в метанолі.

Валідація розробленої методики

Згідно з вимогами ДФУ, при внесенні аналітичної методики до нормативних документів обов'язковою є процедура валідації. Тому розроблену спектрофотометричну методику кількісного визначення 1-бензил-8-морфолінотеоброміну було валідовано за характеристиками: лінійність, діапазон застосування, точність, правильність та робасність [10].

Лінійність та діапазон застосування

При визначенні лінійності було проведено визначення для 9 концентрацій у межах діапазону застосування аналітичної методики. Оцінку параметрів лінійної залежності ($y=bx+a$) проводили згідно з вимогами ДФУ за допомогою методу найменших квадратів. Було визначено такі числові показники лінійної залежності, як b , S_b , a , S_a , $S_{x,0}$ та r (табл. 1), а також побудовано в нормалізованих координатах графік залежності абсорбції від концентрації аналізованих розчинів (рис. 2).

Результати проведених досліджень, наведені в таблиці 1, свідчать про те, що параметри лінійної залежності відповідають вимогам ДФУ. Доведено, що розроблена методика є лінійною в усьому діапазоні застосування, який складає 61–139 %, що є ширшим від фармакопейних вимог (80–120 %).

Точність та правильність

Для оцінки правильності та точності розробленої методики використали результати, отримані при визначенні лінійності.

Доведено, що методика аналізу характеризується достатньою збіжністю та правильністю в усьому діапазоні концентрацій, про що свідчать дані, наведені у таблиці 2, – одnobічний довірчий інтервал не перевищує максимально допустиму невизначеність аналізу та систематична похибка статистично не відрізняється від нуля, тобто істинне значення величини не виходить за межі встановленого довірчого інтервалу.

Робасність

Перевірка стабільності досліджуваних розчинів у часі є одним з елементів вивчення робасності методики, яку було проведено перед початком усіх інших валідаційних досліджень.

Доведено, що розчини, які проаналізовано, залишаються стабільними протягом 60 хв – систематична похибка δ , що вноситься їхньою нестабільністю, не перевищує критичного значення $t_{\alpha\delta}$ (табл. 3).

Прогноз повної невизначеності методики

Для підтвердження того, що розроблена методика буде відтворюватись в інших лабораторіях, результатів валідації в одній лабораторії недостатньо.

Таблиця 1. Числові показники лінійної залежності

Величина	Значення	Критерій	Висновок
$b \pm (S_b)$	0,9982±(0,002381)	–	–
$a \pm (S_a)$	0,4935±(0,2453)	$ a \leq \Delta a = t(95\%; 7) \cdot S_a = 0,5789$	відповідає
$S_{x,0}(\%)$	0,1951	$\leq \Delta_{AS}(\%) / t(95\%; 7) = 1,0556$	« »
r	0,9999	$\geq 0,9970$	« »

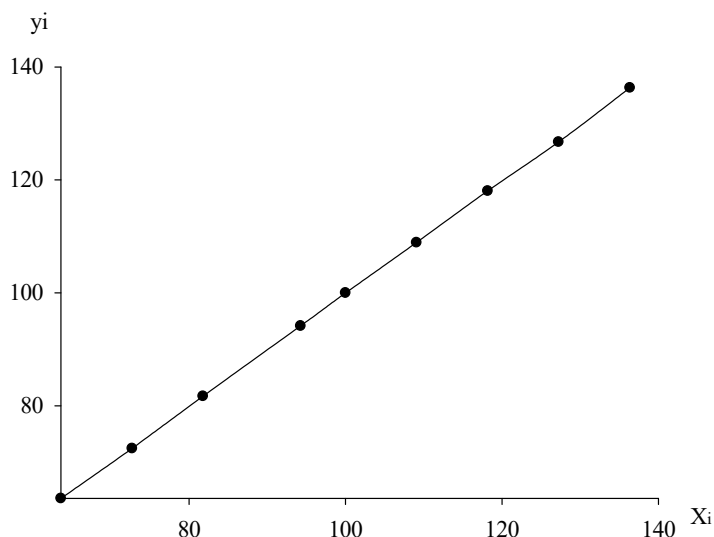


Рис. 2. Графік залежності абсорбції розчину від концентрації 1-бензил-8-морфолінотеоброміну в нормалізованих координатах.

Таблиця 2. Визначення правильності та прецизійності кількісного визначення 1-бензил-8-морфолінотеоброміну в субстанції

Знайдено у % до введеного $Z_i = 100 \cdot (Y_i/X_i) \%$	100,0
	99,67
	99,91
	99,90
	100,0
	99,87
	99,91
	99,60
	99,98
Середнє, \bar{z} , %	99,87
Відносне стандартне відхилення, S_z , %	0,143
Відносний довірчий інтервал, $\Delta\% = t(95\%, 8) \cdot S_z$	0,266
Критичне значення для відтворюваності результатів $\Delta\% \leq$	0,640
Систематична похибка, $\delta = \bar{z} - 100 $	0,130
Критерій незначущості систематичної погрешності $\delta \leq \Delta/3 = 0,0887$; якщо не виконується, то $\delta \leq 0,32 \cdot B = 0,640$	Не виконується Виконується
Загальний висновок про методику	Коректна

Таблиця 3. Стабільність аналізованих розчинів у часі

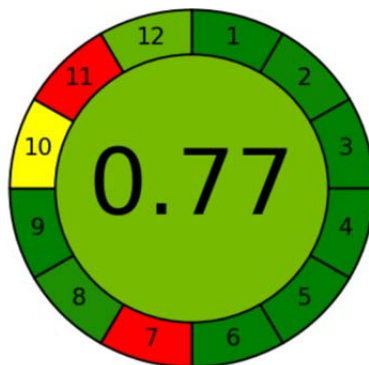
t, хв	0	15	30	45	60	Середнє	RSD_r , %	Δ_t , %	$max\delta$, %
о	0,9624	0,9631	0,9633	0,9655	0,9690	0,9647	0,279	0,594	0,640

Необхідно провести прогноз повної невизначеності методики згідно з вимогами ДФУ, що включає невизначеність пробопідготовки та прогнозовану невизначеність кінцевої аналітичної операції.

Прогнозована повна невизначеність результатів аналізу $\Delta_{As}=1,53$ % та не перевищує критичного значення $max\Delta_{As}=2,0$ %, тобто результати, отримані за даною методикою, будуть коректними при виконанні її в інших лабораторіях.

Оцінка «зеленості» методики

Оцінку «зеленості» розробленої методики кількісного спектрофотометричного визначення 1-бензил-8-морфолінотеоброміну в субстанції було проведено за методом AGREE, оскільки він враховує усі 12 принципів екологічної аналітичної хімії [12]. Результати, які наведені на рисунку 3, свідчать про те, що розроблена методика належить до «зеленої» категорії і є безпечною для навколишнього середовища.

**Рис. 3.** Оцінка «зеленості» розробленої методики за методом AGREE.

Висновки. У роботі розроблено просту, експресну та безпечну для навколишнього середовища спектрофотометричну методику кількісного визначення 1-бензил-8-морфолінотеоброміну в субстанції. Доведено, що розроблена методику є валідною за харак-

теристиками: лінійність, діапазон застосування, прецизійність, правильність та робастність.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF 1-BENZYL-8-MORPHOLINOTEOBROMINE

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

Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University

lebed_yuliya@i.ua

The aim of the work. Development and validation of a spectrophotometric method for quantitative determination of 1-benzyl-8-morpholinoteobromine in substance according to pharmacopoeial requirements.

Materials and Methods. The research material is the substance of 1-benzyl-8-morpholinoteobromine. The solvent is methanol. Analytical equipment: spectrophotometer Specord 200 (Analytic Jena AG, Germany), electronic laboratory scale RADWAG XA 210.4Y, ultrasonic bath Sonorex Digitec DT100H, class A measuring vessels.

Results and Discussion. A wavelength range of 260–320 nm with a maximum absorbance at 292 nm was selected for the development of the quantitative determination methodology. The validation of the method was carried out in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine for such characteristics as the range of application, linearity, precision, correctness and robustness, and the predicted total uncertainty of the method was calculated. The range of application of the technique lies within 61–139 %. The calculated parameters testify to the linearity of the technique in the studied range of application. The calculated one-sided confidence interval does not exceed the maximum permissible uncertainty of the analysis, which indicates the accuracy of the method at the level of convergence. The method is correct, because the systematic error does not statistically differ from zero, that is, the true value of the quantity does not go beyond the established confidence interval. The analyzed solutions are stable for at least 60 minutes, since the systematic error introduced by the instability of the analyzed solutions does not exceed a critical value.

Conclusion. As a result of the study, a simple, rapid and environmentally safe spectrophotometric method for the quantitative determination of 1-benzyl-8-morpholinoteobromine in a substance was developed. It is proved that the developed method is valid according to the characteristics such as linearity, range of application, precision, correctness and robustness.

Key words: 1-benzyl-8-morpholinoteobromine; quantitative determination; UV spectrophotometry; validation; AGREE.

Перелік бібліографічних посилань

1. Коваленко В. М. КОМПЕНДІУМ 2019 – лікарські препарати. Київ : Моріон, 2019. 2480 с.
2. Orhan H. Biotransformation of Drugs and other Xenobiotics as Key Modulator of Toxicity. *Current Drug Metabolism*. 2021. Vol. 22, No. 8. P. 582–583. DOI: 10.2174/138920022208210915160901.
3. Bioactivation and Reactivity Research Advances – 2021 year in review. K. D. Jackson, U. A. Argikar, S. Cho et al. *Drug Metabolism Reviews*. 2022. P. 1–83. DOI: 10.1080/03602532.2022.2097254.
4. Bronchospasmolytic activity and adenosine receptor binding of some newer 1,3-dipropyl-8-phenyl substituted xanthine derivatives. D. Gumber, D. Yadav, R. Yadav et al. *Chemical Biology & Drug Design*. 2020. Vol. 95, No. 6. P. 600–609. DOI: 10.1111/cbdd.13673.
5. Treatment of COVID-19 with pentoxifylline: Could it be a potential adjuvant therapy? F. Seirafianpour, S. Mozafarpour, N. Fattahi et al. *Dermatologic Therapy*. 2020. Vol. 33, No. 4. DOI: 10.1111/dth.13733.
6. Ligand-based design, synthesis and biological evaluation of xanthine derivatives as LSD1/KDM1A inhibitors. Q.-S. Ma, Y. Yao, Y. C. Zheng et al. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019. Vol. 162. P. 555–567. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.11.035.
7. Synthesis, physical, chemical and biological properties of 7-ethylxanthinyl-8-aminoalkanoic acids derivatives. O. P. Dolhikh, M. I. Romanenko, D. H. Ivanchenko et al. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2019. Т. 12, № 1(29). С. 10–14. DOI: 10.14739/2409-2932.2019.1.158921.
8. 8-Alkylmercaptocaffeine derivatives: antioxidant, molecular docking, and in-vitro cytotoxicity studies. S. Sargazi, S. Shahraki, O. Shahraki et al. *Bioorganic Chemistry*. 2021. Vol. 111. P. 104900. DOI: 10.1016/j.bioorg.2021.104900.
9. Синтез, фізико-хімічні та біологічні властивості 8-амінопохідних 1-бензилтеоброміну / Романенко М. І. та ін. *Запорізький медичний журнал*. 2006. № 3 (36). С. 142–146.
10. Ivanchenko D. H., Zhuk Y. M., Vasyuk S. O. Кількісне визначення піперидину 7-пропіл-3-метилксантин-8-ілітоацетату. *Фармацевтичний часопис*. 2022. № 4. С. 20–25. DOI: 10.11603/2312-0967.2022.4.13735.
11. Державна Фармакопея України / підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр».

1-ше вид. Харків: PIPEГ, 2001. 556 с. Доповнення 1. 2004. 520 с. Доповнення 2. – Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 2008. 620 с. Доповнення 3. 2009. 280 с. Доповнення 4. 2011. 540.

12. Francisco Pena-Pereira, Wojciech Wojnowski, Marek Tobiszewski. AGREE – Analytical GREENness Metric Approach and Software. *Analytical chemistry*. 2020. Vol. 92, No. 14. P. 10076–10082. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c01887.

References

1. Kovalenko VM. COMPENDIUM 2019 – medicinal products. [КОМПЕНДИУМ 2019 – лікарські засоби] К. : Morion 2019. 2480 p. Ukrainian.
2. Orhan H. Biotransformation of Drugs and other Xenobiotics as Key Modulator of Toxicity. *Curr Drug Metab*. 2021. 22(8):582–3. DOI: 10.2174/138920022208210915160901.
3. Jackson KD, Argikar UA, Cho S, Crouch RD, Driscoll JP, Heck C et al. Bioactivation and Reactivity Research Advances – 2021 year in review. *Drug Metab Rev*. 2022;1-83. DOI: 10.1080/03602532.2022.2097254.
4. Gumber D, Yadav D, Yadav R, Kachler S, Klotz KN. Bronchospasmolytic activity and adenosine receptor binding of some newer 1,3-dipropyl-8-phenyl substituted xanthine derivatives. *Chem Biol Amp Drug Des*. 2020;95(6):600–9. DOI: 10.1111/cbdd.13673.
5. Seirafianpour F, Mozafarpour S, Fattahi N, Sadeghzadeh-Bazargan A, Hanifiha M, Goodarzi A. Treatment of COVID-19 with pentoxifylline: Could it be a potential adjuvant therapy? 2020; 33(4). DOI: 10.1111/dth.13733.
6. Ma QS, Yao Y, Zheng YC, Feng S, Chang J, Yu B et al. Ligand-based design, synthesis and biological evaluation of xanthine derivatives as LSD1/KDM1A inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2019; 162:555–67. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.11.035.
7. Dolhikh OP, Romanenko MI, Ivanchenko DH, Aleksandrova KV, Polishchuk NM. Synthesis, physical, chemical and biological properties of 7-ethylxanthinyl-8-aminoalkanoic acids derivatives. *Curr Issues Pharm Med*. 2019; 1(29):10–14. DOI: 10.14739/2409-2932.2019.1.158921.
8. Sargazi S, Shahraki S, Shahraki O, Zargari F, Sheervalilou R, Maghsoudi S et al. 8-Alkylmercaptocaffeine derivatives: antioxidant, molecular docking, and in-vitro cytotoxicity studies. *Bioorganic Chem*. 2021;111:104900. DOI:10.1016/j.bioorg.2021.104900.
9. Romanenko MI, Ivanchenko DH, Samura BB, Samura IB, Glushenko MV, Kaptuh RP. Synthesis, physicochemical and biological properties of 8-amino derivatives of 1-benzyltheobromine. *Zaporizhzhia med zhurn*. 2006; 3 (36): 142–146.
10. Ivanchenko DH, Zhuk YM, Vasyuk SO. Quantitative determination of piperidine 7-propyl-3-methylxanthine-8-ithioacetate. *Farm chasop.* 2022;(4):20-5. DOI: 10.11603/2312-0967.2022.4.13735.
11. The State Pharmacopoeia of Ukraine. [Державна фармакопея України] Kharkiv: Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center of Quality of Medicinal Products. 1 ed. X; 2001; 556 p. Ed. 1. 2004; 520 p. Ed. 2. Kharkiv: Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center of Quality of Medicinal Products. 2008; 620 p. Ed 3. 2009; 280 p. Ed. 4. 2011; 540 p. Ukrainian.
12. Pena-Pereira F, Wojnowski W, Tobiszewski M. AGREE – Analytical GREENness Metric Approach and Software. *Analyt chem*. 2020; 92 (14): 10076–10082. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c01887.

Відомості про авторів

Іванченко Д. Г. – доктор фармацевтичних наук, професор, завідувач кафедри біологічної хімії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, м. Запоріжжя, Україна. E-mail: ivanchenko230181@gmail.com, ORCID: 0000-0001-9858-2659.

Васюк С. О. – доктор фармацевтичних наук, професор, завідувач кафедри аналітичної хімії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, м. Запоріжжя, Україна. E-mail: vasjuk@zsmu.zp.ua, ORCID: 0000-0002-1569-9374.

Жук Ю. М. – кандидат фармацевтичних наук, старший викладач кафедри аналітичної хімії, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, м. Запоріжжя, Україна. E-mail: lebed_yuliya@i.ua, ORCID: 0000-0003-0153-5739.

Information about the authors

Ivanchenko D. G. – DSc (Pharmacy), Professor, Head 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.

Zhuk Y. M. – PhD, Senior Lecturer of Analytical Chemistry Department, Zaporizhzhia State Medical University, Zaporizhzhia, Ukraine. E-mail: lebed_yuliya@i.ua, ORCID 0000-0003-0153-5739.