

УДК: 615.213:658.562.47:547.791.1

## Н.Ю. Бевз, В.А. Георгіянц, Л.О. Перехода, П.О. Безуглий, І.А. Сич РОЗРОБКА МЕТОДИК ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ДИФЕНТРИКАРБУ

Національний фармацевтичний університет

**Бевз Н.Ю., Георгіянц В.А., Перехода Л.О., Безуглий П.О., Сич І.А.** Розробка методик ідентифікації та кількісного визначення дифентрикарбу // Український медичний альманах. – 2013. – Том 16, № 4. – С. 11-14.

У роботі наведені дані по розробці методик ідентифікації та кількісного визначення нової біологічно активної речовини з проти судомною дією. Ідентифікацію досліджуваної речовини проводили фізико-хімічними (ІЧ- та УФ-спектроскопія) методами та хімічними реакціями. Для кількісного визначення дифентрикарбу розроблений спектрофотометричний метод на ультрафіолетовій ділянці спектру. Розрахунок вмісту діючої речовини рекомендовано проводити методом показника поглинання.

**Ключові слова:** фармацевтичний аналіз, ідентифікація, кількісне визначення, спектрофотометрія, протисудомний засіб.

**Бевз Н.Ю., Георгіянц В.А., Перехода Л.А., Безуглий П.А., Сич І.А.** Разработка методик идентификации и количественного определения дифентрикарба // Украинский медицинский альманах. – 2013. – Том 16, № 4. – С. 11-14.

В работе приведены данные по разработке методик идентификации и количественного определения нового биологически активного вещества с противосудорожным действием. Идентификацию исследуемого вещества проводили физико-химическими (ИК- и УФ-спектроскопия) методами и химическими реакциями. Для количественного определения дифентрикарба разработан спектрофотометрический метод в ультрафиолетовой области спектра. Расчет содержания действующего вещества рекомендовано проводить методом показателя поглощения.

**Ключевые слова:** фармацевтический анализ, идентификация, количественное определение, спектрофотометрия, противосудорожное средство.

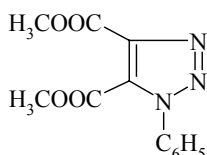
**Bevz N.Y., Georgiyants V.A., Perekhoda L.O., Bezugly P.O., Such I.A.** Development of the method for identification and assay of diphenetricarb // Украинский медицинский альманах. – 2013. – Том 16, № 4. – С. 11-14.

The article presents data on development of methods for identification and assay of new biologically active substances with the anticonvulsant action. Identification of the substance under research has been carried out by physicochemical (IR and UV spectroscopy) methods and chemical reactions. To determine diphenetricarb quantitatively the spectrophotometric method in the ultraviolet area of the spectrum has been developed. Calculation of the content of the active ingredient has been recommended to perform by the absorption parameter method.

**Key words:** pharmaceutical analysis, identification, quantitative determination, spectrophotometry, anticonvulsant.

У Національному фармацевтичному університеті отриманий ряд сполук серед похідних триазолу, які можуть знайти застосування як перспективні протисудомні засоби оригінальної будови і такі, що відрізняються за своїм механізмом дії від тих, що застосовуються в медичній практиці [1,2]. Саме впровадження в медичну практику біологічно активних речовин, що принципово відрізняються за будовою від існуючих, дає вірогідність включення принципово інших механізмів протисудомної дії і дозволяють сподіватися на активність при судомних різноманітній етіології. Подальше поглиблене дослідження таких речовин вимагає докладного вивчення фізико-хімічних властивостей, що дозволить не тільки стандартизувати такі речовини, але й вивчити перспективну поведінку ксенобіотику в організмі людини, його фармакодинаміку та фармакокінетику, що дозволить розробити обґрунтовані рекомендації до застосування. Крім того, такі дослідження є необхідними для фармацевтичної розробки технології лікарської форми.

Серед всіх сполук, що перевищували за своєю активністю препарати порівняння, нами було обрано найбільш активний диметилловий естер 1-феніл-1,2,3-триазол(1H)-4,5-дикарбонової кислоти під умовною назвою дифентрикарб [3,4].



Робота виконана відповідно до плану науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету з проблеми МОЗ України «Розробка та валідація методів контролю якості лікарських засобів аптечного та промислового виробництва» (номер державної реєстрації 0108U010944).

**Мета роботи:** Для підготовки названої речовини до впровадження нами було здійснено розробку методик контролю якості для складання аналітично-нормативної документації. Стандартизацію здійснювали відповідно до існуючих сучасних вимог до розробки методик аналізу фармацевтичних субстанцій фармакопейної якості [5,6,7].

**Матеріали та методи дослідження.** Досліди проводились з використанням хроматографічно чистого зразку сполуки (вміст домішок 0,5%). У роботі застосовували мірний посуд класу А, реактиви, які відповідають вимогам ДФУ, аналітичні ваги «AXIS», спектрофотометр “Specord M-40”, хроматографічні пластинки з шаром силікагелю GF<sub>254</sub>. ІЧ-спектр субстанції записано на приладі “Specord M-80” у таблетках КВг, концентрація речовини 1%.

### Ідентифікація

Інфрачервоний спектр поглинання має відповідати ІЧ-спектру поглинання СЗ дифентрикарбу.

1 мг досліджуваної речовини розчиняють у 2 мл метанолу та додають 2 мл лужного розчину гідроксиламіну. Реакційну суміш збовтують протягом 5 хв, додають 2 мл розведеної хлорводневої кислоти та 0,5 мл 10% розчину заліза

(III) хлориду; утворюється фіолетово-червоне забарвлення.

0,01г субстанції розчиняють у 5 мл кислоти хлористоводневої розведеної, потім додають 1 мл розчину калію йодовісмутату. Відразу спостерігається утворення жовтогарячого осаду.

#### Кількісне визначення.

0,050 г субстанції розчиняють у 96% спирті етилового при нагріванні, розчин охолоджують і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100,0 мл. 2,0 мл одержаного розчину доводять 96% спиртом етиловим до об'єму 100,0 мл. Оптичну густину одержаного розчину вимірюють у максимумі за довжини хвилі 246 нм. Вміст  $C_{12}H_{11}N_3O_4$  обчислюють, використовуючи питомий показник поглинання, що дорівнює 484.

**Результати дослідження та їх обговорення.** За фізичними властивостями дифентрикарбу є дрібнокристалічний порошок білого кольору, без запаху, легко розчинний у диметилформаміді, діоксані, хлороформі, розчинний в гарячому етанолі та ізопропанолі, нерозчинний у воді. Для визначення розчинності використовувалися стандартні фармакопейні методики [6].

Державна фармакопея України рекомендує для ідентифікації органічних сполук використовувати метод інфрачервоної спектроскопії [5]. Поглинання речовини в ІЧ-області дає змогу виявити функціональні групи та окремі фрагменти в структурі. Тому речовини методом ІЧ-спектроскопії ідентифікують або методом стандарту, або перераховуючи положення основних функціональних груп. Аналізуючи ІЧ-спектр диметилового естеру 1-феніл-1,2,3-триазол(1H)-4,5-дикарбонової кислоти (рис. 1) можна відзначити ряд характеристичних смуг, що проявляються завдяки наявності тих чи інших особливостей хімічної будови. На ділянці найбільш високих частот (3600-2800  $cm^{-1}$ ) знаходяться смуги валентних коливань функціональних груп з «легкими» атомами гідрогену [8].

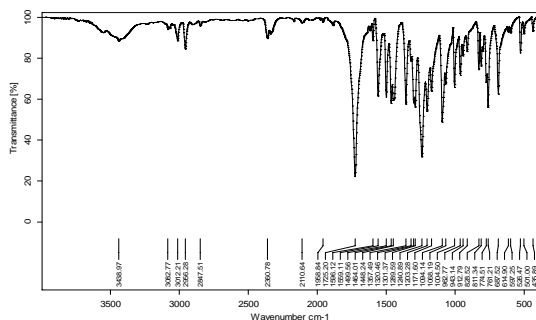


Рис. 1. ІЧ-спектр диметилового естеру 1-феніл-1,2,3-триазол(1H)-4,5-дикарбонової кислоти

Як видно з рисунку в ІЧ-спектрі сполуки на високочастотній ділянці визначаються смуги поглинання ароматичних зв'язків С-Н при 3082  $cm^{-1}$  та 3012  $cm^{-1}$ . Відповідно до загальноприйнятих принципів інтерпретації ІЧ-спектрів при 2847  $cm^{-1}$  спостерігаються симетричні валентні коливання двох метоксигруп, при 2956  $cm^{-1}$  – асиметричні валентні коливання цих же групи.

Відносно висока їх інтенсивність обумовлена наявністю двох метильних груп у молекулі.

На ділянці від 2100  $cm^{-1}$  до 1750  $cm^{-1}$  можна спостерігати ряд смуг слабкої інтенсивності, що відповідають комбінаційним коливанням ароматичних СН-зв'язків [9].

Найбільш інтенсивна смуга на спектрі при 1725  $cm^{-1}$  являє собою смугу валентних коливань карбонільної групи, що разом зі смугою валентних коливань зв'язку С-О-С при 1240  $cm^{-1}$  дозволяє надійно підтвердити наявність у молекулі естерного угруповання [10].

Смуги поглинання скелету органічної молекули (зв'язки С-С, С-Н, N-N) знаходяться на ділянці 1500-700  $cm^{-1}$ , що традиційно має назву ділянки «відбитків пальців» і найбільш широко використовується для ідентифікації сполук. Тут можна спостерігати скелетні коливання ароматичних С-С зв'язків бензольного та триазольного кілець з хвильовими числами 1596, 1499 та 1448  $cm^{-1}$ , на цій же ділянці спостерігаються антисиметричні та симетричні деформаційні коливання метильних груп при 1464 та 1357  $cm^{-1}$  відповідно. Смуга валентного коливання зв'язків С-Н залишку триазолу розташована при 1289  $cm^{-1}$ . Її розташування є близьким до смуг валентних коливань зв'язку С-С, а інтенсивність – значно більшою за рахунок більшої полярності зв'язку С-Н [9].

Доволі інтенсивне поглинання на ділянці нижче 900  $cm^{-1}$  є свідченням наявності позаплощинних деформаційних коливань зв'язків СН ароматичного кільця. До них можна віднести смуги при 761 та 687  $cm^{-1}$ . Площинні деформаційні коливання ароматичного кільця проявляються смугою при 1171  $cm^{-1}$ , але зазвичай ця смуга не відіграє значної ролі при інтерпретації ІЧ-спектру [9].

УФ-спектр поглинання дифентрикарбу містить максимум за довжини хвилі 246 нм (рис 2).

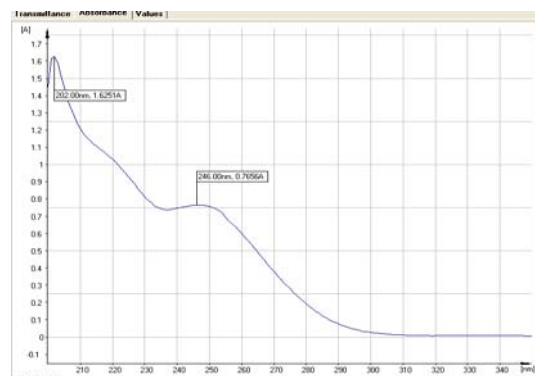


Рис. 2. УФ-спектр диметилового естеру 1-феніл-1,2,3-триазол(1H)-4,5-дикарбонової кислоти (дифентрикарбу)

Максимум за довжини хвилі 246 нм доволі пологий, що дозволяє розглядати можливість його використання не тільки для ідентифікації, але й для кількісного визначення речовини. Для більш якісної оцінки досліджуваної сполуки, доцільно було розрахувати питомий показник поглинання в максимумі 246 нм, який складає 484.

Для підтвердження у будові досліджуваної речовини третинних атомів нітрогену використовували реакції з загальноалкалоїдними реактивами, естерних угруповань – реакцію утворення гідроксамату заліза (III) та фенольного радикалу – за знебарвленням бромної води.

Кількісне визначення дифентрикарбу проводили методом абсорбційної спектрофотометрії у спиртовому розчині за довжини хвилі 246 нм. Розрахунок кількісного вмісту проводили методом показника поглинання.

Для застосування методики вивчали валідаційні характеристики: робасність, лінійність, правильність, стабільність аналітичних розчинів,

Таблиця 1. Стабільність аналітичного розчину у часі

№ розчину	Термін дослідження стабільності t, хв.					середнє	RSDt, %	Δt, %	max δ, %
	0	15	30	45	60				
A <sub>1</sub>	0,485	0,483	0,485	0,484	0,484	-	-	-	0,64
A <sub>2</sub>	0,483	0,485	0,485	0,483	0,485	-	-	-	
A <sub>3</sub>	0,484	0,485	0,486	0,483	0,486	-	-	-	
A <sub>ср</sub>	0,4840	0,4843	0,4853	0,4833	0,4850	0,4844	0,1643	0,3502	

Таблиця 2. Вплив рН на оптичну густина аналітичного розчину

№ розчину	Оптичні густини A <sub>1</sub> середнє трьох вимірів			середнє	SrpH	RSDpH, %	ΔpH, %	max δ, %
	Випробування							
	1 – 0,01M HCl	2 – без додавання	3 – 0,01M NaOH					
1	0,487	0,484	0,485	0,3621	0,0010	0,10	0,30	0,64
2	0,488	0,485	0,483	0,4016	0,0022	0,22	0,62	
3	0,486	0,484	0,482	0,4419	0,0016	0,16	0,46	

Встановлено, що досліджуваний спиртовий розчин речовини стійкий протягом 1 год та вплив коливань рН не вносить значних змін до величини оптичної густини. Враховуючи стандартизовану процедуру проведення валідації

Таблиця 3. Розрахунок критеріїв прийнятності методики

№	Критерій прийнятності	Значення
1	Допуски вмісту (B, %)	± 2 %
2	Максимально допустима повна невизначеність (maxΔ <sub>AS</sub> )	2,0 %
3	Максимальна систематична похибка (δ, %)	0,64 %
4	Критичне значення залишкового стандартного відхилення, max S <sub>0</sub>	1,06
5	Критичне значення індексу кореляції, r	0,99702
6	Критичне значення практичної невизначеності вільного члена лінійної залежності, a	3,2

Для підтвердження специфічності розраховували відносну систематичну погрішність, яку вносять розчинник, (плацебо). Для цього вимірювали оптичну густина (A<sub>blank</sub>) розчину плацебо три рази з вийманням кювети, та оптичну густина (A<sub>100%</sub>) середнього розчину. Знайдені середні значення: A<sub>blank</sub>=0,002; A<sub>100%</sub>=0,484, свідчать, що вклад плацебо в сумарне поглинання аналітичного розчину складає:

$$\delta_{exc} = 100 \cdot 0,0003 / 0,484 = 0,41 \%$$

що підтверджує про відсутність вагомого впливу на результати вимірів.

Лінійність методики вивчали в діапазоні концентрацій від 80% до 120% від номінальної. Розраховували відношення середніх значень оптичних густин для кожного з 15 розчинів до середнього значення оптичної густини розчину порівняння, одержуючи величини  $X_i = C_i / C_{st} \cdot 100\%$ ,  $Y_i = (A_i / A_{st}) \cdot 100$ . Працювали в нормалізованих координатах, подаючи концентрації та аналітичний сигнал у відсотках до номінальних значень. Знаходили також величину

прецизійність, збіжність, відтворюваність, розрахувати невизначеність пробо підготовки [7].

Невизначеність пробопідготовки розраховували виходячи з методики кількісного визначення і встановлено, що пробопідготовка (0,66%) не суттєво впливає на maxΔ<sub>AS</sub>.

Робасність вивчали, спостерігаючи стабільність розчинів у часі та вплив рН (табл. 1,2).

Для вивчення впливу рН середовища штучно створювали коливання рН ±10% (для аналітичного розчину приготованого за методикою). Коливання рН відтворювали штучно додаючи по 1 краплі 0,01 M розчину HCl або 0,01 M розчину NaOH (табл. 2).

перед визначенням інших валідаційних параметрів проводили розрахунок критеріїв прийнятності методики (табл. 3), який проводили відповідно до вимог ДФУ:

$Z = 100 \cdot (Y_i / X_i)$ , яка є знайденою концентрацією у відсотках до введеної (рис. 3).

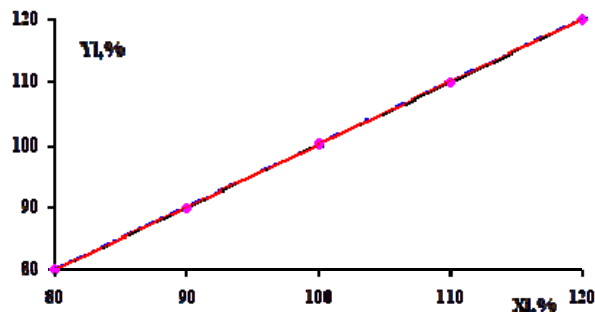


Рис. 3. Графік лінійної залежності в нормалізованих координатах

Результати статистичного розрахунку лінійності наведені в таблиці 4.

Таблиця 4. Результати дослідження лінійності

кутовий коефіцієнт лінійної залежності $b$	0,998917
$S_b$	0,0066
вільний член лінійної залежності $a$	-0,2078
критичне значення для вільного члена лінійної залежності $a$	3,2
$S_a$	2,0538
остаточне стандартне відхилення $S_{\text{rest}}$	0,3621
критичне значення для остаточного стандартного відхилення	1,06
коефіцієнт кореляції методики	0,9997
критерій лінійного коефіцієнту кореляції	0,99702

Користуючись принципом паралельного проведення валідації збіжність та правильність визначали одночасно (табл. 5).

Таблиця 5. Правильність та збіжність аналітичної методики

№ модельного розчину	Наважки, г	Введено у % до концентрації середнього розчину	Оптичні густини $A_i$	Знайдено у % до концентрації середнього розчину ( $v_i\%$ )	Знайдено у % до введеного $Z_i=100(Y_i/X_i)$
1	0,0402	80,46	0,387	79,93	99,35
2	0,0400	80,00	0,386	79,73	99,66
3	0,0403	80,51	0,388	80,14	99,54
4	0,0450	90,00	0,435	89,85	99,83
5	0,0452	90,36	0,436	90,05	99,66
6	0,0453	90,50	0,438	90,47	99,96
7	0,0508	101,50	0,485	100,18	98,70
8	0,0500	100,00	0,483	99,76	99,76
9	0,0500	100,00	0,484	99,97	99,97
10	0,0553	110,50	0,534	110,30	99,82
11	0,0550	110,00	0,533	110,09	100,08
12	0,0550	110,00	0,533	110,09	100,08
13	0,0600	120,00	0,579	119,59	99,66
14	0,0603	120,50	0,581	120,00	99,59
15	0,0602	120,37	0,580	119,80	99,52
середнє $Z\%$					99,68
відносне стандартне відхилення, $Sz\%$					0,3449
відносний довірчий інтервал $\Delta as\% = t(95\%, 14) * Sz$					1,0610
критичне значення для збіжності результатів $\Delta as\%$					2,0
систематична похибка					0,32
критерій невизначеності систематичної похибки					0,64
загальний висновок про методику					коректна

Методика є коректною, оскільки виконуються вимоги:  $\Delta z\% \leq \max \Delta as = 2.0\%$  та значуща систематична похибка відсутня.

#### Висновки:

1. Здійснено стандартизацію диметилowego естеру 1-феніл-1,2,3-триазол(1H)-4,5-дикарбоновой кислоти відповідно до вимог Державної фармакопеї України.

2. Запропоновано фізико-хімічні та хімічні методи ідентифікації субстанції.

3. Розроблено спектрофотометричну методику кількісного визначення диметилowego естеру 1-феніл-1,2,3-триазол(1H)-4,5-дикарбоновой кислоти. Здійснено визначення валідаційних параметрів розробленої методики.

4. Розроблені методики ідентифікації та кількісного визначення будуть включені в методику контролю якості на дану речовину з подальшим використанням у фармацевтичному аналізі.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Aldenkamp A. P. Newer antiepileptic drugs and cognitive issues / A. P. Aldenkamp, M. De Krom, R. Reijs // *Epilepsia*. – 2003. – Vol. 44, № 4. – P. 21–29.
2. Abraham D. J. Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, v.2 - Drug Discovery and Drug Development Sixth Edition / D. J. Abraham ed. – A Wiley-Interscience Publication, A John Wiley and Sons, Inc. – 2003. – 817 p.
3. Георгіянц В. А. Синтез та дослідження 1-бензил-1,2,3-триазол(1H)-4,5-дикарбоновых кислот / В. А. Георгіянц, Л. О. Перехода, С. В. Плис // *Вісник фармації*. – 2005. – № 2 (42). – С. 3–6.
4. Перехода Л. О. Синтез та фізико-хімічні властивості метилових ефірів 1-арил-1,2,3-триазол(1H)-4,5-дикарбоновых кислот / Л. О. Перехода, В. А. Георгіянц, С. В. Плис и др. // *Журнал органічної та фармацевтичної хімії* – 2007. – Т. 5, випуск 2(18). – С. 45–48 Державна фармакопея України / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х.: ООО «РИРЕГ», 2001. – 556 с.
6. Державна фармакопея України / Держ. п-во

«Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х.: ООО «РИРЕГ», 2001. – Доповнення 1. – 2004. – 520 с.

7. Державна фармакопея України / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х.: ООО «РИРЕГ», 2001. – Доповнення 2. – 2008. – 520 с.

8. Казицына Л. А. Применение УФ-, ИК- и ПМР-спектроскопии в органической химии / Л. А. Казицына, Н. Б. Куплетская. – М.: Высш. шк., 1971. – 264 с.

9. Наканиси К. Инфракрасные спектры и строение органических соединений / К. Наканиси. – М.: Мир, 1965. – 216 с.

10. Silverstein R.M. Spectrometric Identification of organic compounds / R. M. Silverstein, X. W. Francis – 6<sup>th</sup> ed. – NY: John Wiley & Sons, 2001. – 196 p.

Надійшла 12.06.2013 р.

Рецензент: проф. Л.В.Савченкова