



УДК 543.061: 547.822.3]:547.857.3

DOI <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2022.4.13735>

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ПІПЕРИДИНУ 7-ПРОПІЛ-3-МЕТИЛКСАНТИН-8-ІЛТІОАЦЕТАТУ

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

Запорізький державний медичний університет

lebed_yuliya@i.ua

ІНФОРМАЦІЯ

Надійшла до редакції / Received:
10.10.2022

Після доопрацювання / Revised:
14.11.2022

Прийнято до друку / Accepted:
22.11.2022

Ключові слова:

піперидину 7-пропіл-3-метилксантин-8-ілтїоацетату;
кількісне визначення;
УФ-спектрофотометрія;
валїдація.

АНОТАЦІЯ

Мета роботи. Розробка та валїдація УФ-спектрофотометричної методики кількісного визначення піперидину 7-пропіл-3-метилксантин-8-ілтїоацетату.

Матеріали і методи. Об'єкт дослідження – субстанція піперидину 7-пропіл-3-метилксантин-8-ілтїоацетату. 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 260–340 нм з максимумом світлопоглинання при 295 нм. Згідно з вимогами ДФУ, було проведено валїдацію методики за такими валїдаційними характеристиками, як діапазон застосування, лінійність, прецизійність, правильність та робастність, а також розраховано прогноз повної невизначеності методики. Діапазон застосування методики лежить у межах 60–140 %. Розраховані числові показники лінійності свідчать про те, що методика є лінійною в усьому діапазоні застосування методики. Розрахований одnobічний 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. Доведено, що систематична похибка δ , яка вноситься нестабільністю аналізованого розчину, не перевищує критичного значення $тах\delta$, тобто розчин залишається стабільним впродовж щонайменше 1 год.

Висновок. Розроблено та валїдовано УФ-спектрофотометричну методику кількісного визначення піперидину 7-пропіл-3-метилксантин-8-ілтїоацетату.

Вступ. Серед різноманіття вітчизняних та закордонних лікарських засобів для лікування таких патологічних станів, як ішемічна хвороба серця, ниркова недостатність, порушення мозкового кровообігу, цукровий діабет, подагра та багато інших, дуже малий відсоток складають низькотоксичні лікарські засоби, а отже, пошук нових ефективних

та малотоксичних лікарських препаратів є одним із пріоритетних завдань сучасної фармацевтичної науки.

Основним етапом створення оригінальних лікарських засобів є синтез біологічно активних сполук із низькою токсичністю та високою фармакологічною ефективністю. Як відомо, основна частина лікар-

ських засобів на сучасному фармацевтичному ринку – це синтетичні сполуки [1, 2].

Аналіз літературних джерел показав широкий спектр біологічної активності похідних ксантину. Так, пропонується синтез інгібіторів α -амілази – похідних теофіліну, які містять у положенні 7 фармакофорний фрагмент ацетилену [3]. Наразі використання інгібіторів амілаз розглядається як стратегія лікування цукрового діабету.

Встановлено, що деякі 1,3,7,8-тетразаміщені ксантину інгібують дипептидилпептидазу-IV, внаслідок чого покращується рівень глюкози при цукровому діабеті 2 типу [4]. Також запропоновані похідні 1,3-диметилксантин-7-ілтіазолідину на матриці хітозану як перспективні засоби в терапії цукрового діабету 2 типу [5].

Проліферація ракових клітин шляхом синтезу ДНК розглядається як ключовий біологічний показник, що спостерігається на стадії прогресування канцерогенезу. Отже, очікується, що речовини, які можуть гальмувати такий процес, гальмують стадію прогресування канцерогенезу, тим самим запобігаючи, а також гальмуючи розвиток раку. Georgieva із співавторами запропонувала методики синтезу похідних 1-бензилтеобромін-8-іл тіетанової кислоти, які виявляють антипроліферативну активність [6]. А команді на чолі з Воговієскі вдалось сконструювати молекули, які виявляють протигрибкову та протипухлинну активність [7].

У роботі [8] автори запропонували до поглиблених випробувати похідні ксантину, які за результатами докінгових досліджень інгібують фосфодієстеразу 9 (PDE9A) – перспективний інструмент у кардіології.

Виходячи з вищенаведеного, можна зробити висновок, що цілеспрямований синтез сполук із прогнозованою біологічною дією та створення на їх основі нових високоєфективних та малотоксичних лікарських засобів є актуальним та перспективним напрямом сучасної фармацевтичної науки.

Продовжуючи роботу професора Романенка М. І. з пошуку біологічно активних сполук серед заміщених ксантину, була розроблена методика синтезу піперидину 7-пропіл-3-метилксантин-8-ілтіоацетату та вивчена його біологічна дія. За результатами первинного фармакологічного скринінгу отримана сіль за показником аналітичної активності значно перевершує диклофенак, а за показником протизапальної дії не поступається вищевказаному еталону порівняння. Подальше впровадження АФІ в практичну фармацію потребує розробки методик їх кількісного визначення. Тому метою даної роботи стала розробка методики кількісного визначення піперидину 7-пропіл-3-метилксантин-8-ілтіоацетату в субстанції, а також валідація цієї методики згідно з вимогами ДФУ.

Матеріали і методи. Об'єкт дослідження – субстанція піперидину 7-пропіл-3-метилксантин-8-

ілтіоацетату. 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 піперидину 7-пропіл-3-метилксантин-8-ілтіоацетату в субстанції: точну наважку піперидину 7-пропіл-3-метилксантин-8-ілтіоацетату (0,0420–0,0980 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 ємністю 25,00 мл переносять 1,00 мл отриманого розчину та доводять водою очищеною до позначки, ретельно перемішують. Абсорбцію отриманих розчинів вимірюють на фоні розчинника при довжині хвилі 295 нм. Паралельно проводять визначення з 1,00 мл 0,07 % розчину порівняння піперидину 7-пропіл-3-метилксантин-8-ілтіоацетату, який готують шляхом розчинення точної наважки піперидину 7-пропіл-3-метилксантин-8-ілтіоацетату у воді очищеній. Вміст діючої речовини у відсотках розраховують за формулою:

$$C_{\%} = \frac{A \cdot C_0 \cdot 100,00 \cdot 25,00}{A_0 \cdot p \cdot 1,00 \cdot l},$$

де А – абсорбція розчину, що аналізується;

A_0 – абсорбція розчину порівняння;

C_0 – концентрація розчину порівняння піперидину 7-пропіл-3-метилксантин-8-ілтіоацетату, що спектрофотометрується (0,0028 г у 100,00 мл);

p – наважка субстанції, г;

l – товщина поглинаючого шару, см.

Результати й обговорення. Спектр поглинання водного розчину піперидину 7-пропіл-3-метилксантин-8-ілтіоацетату в УФ-області спектра характеризується декількома смугами поглинання. Для подальшої розробки методики кількісного визначення даної речовини було обрано смугу, яка спостерігається при 260–340 нм з максимумом світлопоглинання при 295 нм (рис. 1).

Валідація методики

Будь-яка аналітична методика, що пропонується для внесення до будь-якого нормативного документа, повинна бути валідована. Розроблену спектрофотометричну методику кількісного визначення піперидину 7-пропіл-3-метилксантин-8-ілтіоацетату було валідовано згідно з вимогами ДФУ за такими валідаційними характеристиками, як лінійність, діапазон застосування, точність, правильність та робастність [9].

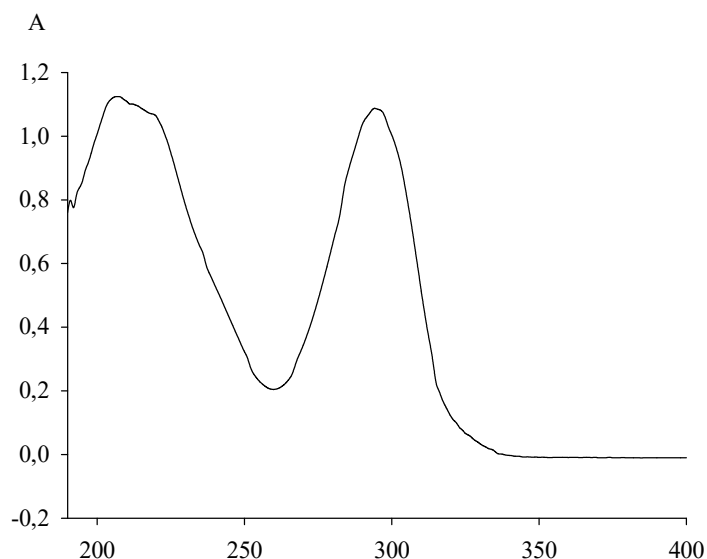


Рис. 1. Крива світлопоглинання водного розчину піперидину 7-пропіл-3-метилксантин-8-ілітоацетату в УФ-області спектра.

Лінійність та діапазон застосування

Для дослідження лінійної залежності вивчали 9 точок (по 3 повтори) у межах діапазону застосування методики.

Розрахунок параметрів лінійної залежності $y = bx + a$ проводили методом найменших квадратів. Результати розрахунків – величини b , S_b , a , S_a , $S_{x,0}$ (залишкове стандартне відхилення), r (коефіцієнт кореляції) наведено в таблиці 1, а отриману в нормалізованих координатах пряму – на рисунку 2.

За даними таблиці 1, в даному випадку виконуються усі вимоги до параметрів лінійної залежності, тобто лінійність методики підтверджується у всьому діапазоні концентрацій 60–140 %, що є не меншим від мінімально допустимого діапазону застосування методики кількісного визначення.

Точність та правильність

Оцінку точності та правильності було проведено, використовуючи результати, отримані при дослідженні лінійності. За даними таблиці 2, запропонована методика аналізу характеризується достатньою збіжністю та правильністю у всьому діапазоні концентрацій 60–140 %.

З отриманих результатів аналізу видно, що методика є точною на рівні збіжності, оскільки одnobічний довірчий інтервал не перевищує максимально допустиму невизначеність аналізу, і правильною, оскільки систематична похибка статистично не відрізняється від нуля, тобто істинне значення величини не виходить за межі встановленого довірчого інтервалу.

Робасність

Одним з елементів дослідження робасності аналітичної методики є вивчення стабільності досліджуваного розчину.

В АНД не регламентується час, через який проводиться вимірювання оптичної густини, тому перевіряли її стабільність впродовж 1 години. Для цього вимірювали по три рази з вийманням кювети оптичну густину аналізованого розчину одразу після приготування, через 15 хв, через 30 хв, через 45 хв та 60 хв. Зазвичай треба довести, що систематична похибка δ , що вноситься його нестабільністю, не перевищує критичного значення $max\delta$. Результати представлені в таблиці 3.

За даними таблиці 3, $\Delta t \leq max\delta$, тобто аналізовані розчини стабільні не менше 1 год.

Таблиця 1

Числові показники лінійної залежності

Величина	Значення	Критерії	Висновок
$b \pm (s_b)$	0,9998 ± (0,00045)	–	–
$a \pm (s_a)$	0,0022 ± (0,0394)	$ a \leq \Delta a = t(95\%;7) \cdot s_a = 0,07465$	Відповідає
$S_{x,0}(\%)$	0,02961	$\leq \Delta_{AS}(\%) / t(95\%;7) = 1,0556$	« »
r	1,0000	$\geq 0,9970$	« »

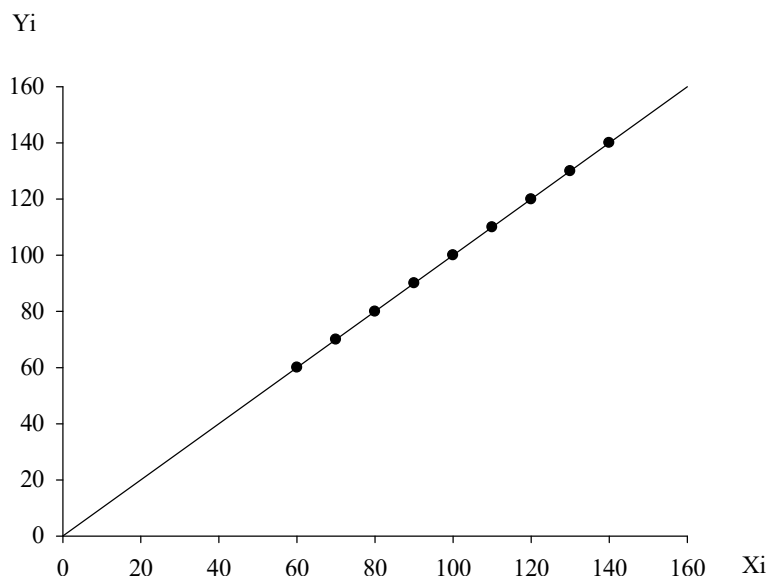


Рис. 2. Графік залежності абсорбції від концентрації піперидину 7-пропіл-3-метилксантин-8-ілітіоацетату в нормалізованих координатах.

Таблиця 2

Визначення правильності та прецизійності кількісного визначення піперидину 7-пропіл-3-метилксантин-8-ілітіоацетату в субстанції

Знайдено у % до введеного $Z_i = 100 \cdot (Y_i/X_i) \%$	100,02
	99,96
	99,95
	100,02
	100,0
	99,97
	99,95
	99,97
	100,0
Середнє, \bar{Z} , %	99,98
Відносне стандартне відхилення, S_z , %	0,0282
Відносний довірчий інтервал, $\Delta\% = t(95\%, 8) \cdot S_z$	0,0525
Критичне значення для відтворюваності результатів $\Delta\% \leq$	0,640
Систематична похибка, $\delta = \bar{Z} - 100 $	0,020
Критерій незначущості систематичної погрешності $\delta \leq \Delta/3 = 0,0175$; 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_t , %	Δ_t , %	$max\delta$, %
o	1,4111	1,3947	1,3960	1,4050	1,4060	1,4107	0,0748	0,159	0,640

Прогноз повної невизначеності методики

Для підтвердження коректності методики при відтворенні її в іншій лабораторії необхідний прогноз повної невизначеності методики. Повна прогнозована невизначеність методики включає невизначеність пробопідготовки та прогнозовану невизначеність кінцевої аналітичної операції. У випадку спектрофотометрії невизначеність кінцевої аналітичної операції становить 0,70 %. Невизначеність пробопідготовки включає складові невизначеності, пов'язані з конкретною операцією пробопідготовки (взяття наважки, аліквоти малого об'єму, доведення до мітки в мірній колбі).

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 у інших лабораторіях.

Висновки. Розроблено спектрофотометричну методику кількісного визначення піперидину 7-пропіл-3-метилксантин-8-ілтіоацетату в субстанції, а також доведено, що за такими валідаційними характеристиками, як лінійність, діапазон застосування, прецизійність, правильність та робастність розроблена методика валідна.

Конфлікт інтересів: відсутній.

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

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF PIPERIDINE 7-PROPYL-3-METHYLXANTHINE-8-YLTHIOACETATE

D. H. Ivanchenko, Y. M. Zhuk, 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 piperidine 7-propyl-3-methylxanthine-8-ylthioacetate.

Materials and Methods. The object of the study is a substance of piperidine 7-propyl-3-methylxanthine-8-ylthioacetate. 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 260–340 nm with a maximum of light absorption at 295 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 60–140 %. The calculated numerical values of linear dependence indicate that the method is linear in the whole range of application methods. The calculated confidence interval does not exceed the maximum allowable uncertainty of the analysis, 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 piperidine 7-propyl-3-methylxanthine-8-ylthioacetate has been developed and validated.

Key words: piperidine 7-propyl-3-methylxanthine-8-ylthioacetate; quantitative determination; UV spectrophotometry; validation.

Список бібліографічних посилань

1. Коваленко В. М. КОМПЕНДІУМ 2019 – лікарські препарати. Київ : Морион, 2019. 2480 с.
2. Vardanyan R. S., Hruby V. J. Synthesis of Essential Drugs. Netherlands: Elsevier, 2006. 617 p.
3. Design, synthesis and biological evaluation of theophylline containing variant acetylene derivatives as α -amylase inhibitors. R. R. Ruddaraju, G. Kiran, A. C. Murugulla. *Bioorganic Chemistry*. 2019. Vol. 92. P. 103–120.
4. Rapid generation of novel benzoic acid-based xanthine derivatives as highly potent, selective and long acting DPP-4 inhibitors: Scaffold-hopping and prodrug study. Q. Li, L. Meng, S. Zhou et al. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019. Vol. 180. P. 509–523.
5. Development, optimization and biological evaluation of chitosan scaffold formulations of new xanthine derivatives for treatment of type-2 diabetes mellitus. F. G. Lupascu, M. Dash, S. K. Samal et al. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015. Vol. 77. P. 122–134.
6. Determination of the antiproliferative activity of new theobromine derivatives and evaluation of their in vitro hepatotoxic effects. M. Georgieva, M. Kondeva-Burdina, J. Mitkov et al. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2016. Vol. 16, Issue 7. P. 925–932.

- Synthesis of novel proxiphylline derivatives with dual Anti-Candida albicans and anticancer activity. P. Borowiecki, P. Wińska, M. Bretner et al. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018. Vol. 150. P. 307–333.
- Nivedita Singh, Swagata Patra, Sanjukta Patra. Identification of Xanthine derivatives as inhibitors of phosphodiesterase 9A through in silico and biological studies. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*. 2018. Vol. 21, Issue 7. P. 476–486.
- Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е 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 с.

References

- Kovalenko VM. COMPENDIUM 2019 – medicinal products. [КОМПЕНДИУМ 2019 – лікарські засоби] Kyiv: Morion 2019. 2480 p. Ukrainian.
- Vardanyan RS. *Synthesis of Essential Drugs*. Netherlands: Elsevier 2006. 617 p.
- Radhakrishnam RR, Gangarapu K, Adharvana CM, Ravichandar M, Devarakonda KP, Boyina HK, Vasudha B, et al. Design, synthesis and biological evaluation of theophylline containing variant acetylene derivatives as α -amylase inhibitors. *Bioorganic Chemistry*. 2019;92: 103120. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103120>.
- Qing L, Liuwei M, Siru Z, Xiaoyan D, Na W, Yi J, Yichun P, et al. Rapid generation of novel benzoic acid-based xanthine derivatives as highly potent, selective and long acting DPP-4 inhibitors: Scaffold-hopping and prodrug study. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019;180: 509-523. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.07.045>.
- Lupascu FG, Dash M, Samal SK, Dubruel P, Lupusoru CE, Lupusoru RV, Dragostin O. Development, optimization and biological evaluation of chitosan scaffold formulations of new xanthine derivatives for treatment of type-2 diabetes mellitus. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;77: 122-34. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.06.008>.
- Georgieva M, Kondeva-Burdina M, Mitkov J, Tzankova V, Momekov G, Zlatkov A. Determination of the antiproliferative activity of new theobromine derivatives and evaluation of their in vitro hepatotoxic effects. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2016;16(7): 925-32.
- Borowiecki P, Wińska P, Bretner M, Gizińska M, Koronkiewicz M, Staniszevska M. Synthesis of novel proxiphylline derivatives with dual Anti-Candida albicans and anticancer activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018;150: 307-33. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.02.077>.
- Nivedita S, Swagata P, Sanjukta P. Identification of Xanthine Derivatives as Inhibitors of Phosphodiesterase 9A Through In silico and Biological Studies. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*. 2018;21(7): 476-86. <https://doi.org/10.2174/1386207321666180821100713>.
- 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.

Відомості про авторів

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.

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

Information about the authors

Ivanchenko D. H. – DSs (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. – DSs (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. – Senior Lecturer of Analytical Chemistry Department, Zaporizhzhia State Medical University, Zaporizhzhia, Ukraine. E-mail: lebed_yuliya@i.uamailto:elenaletska@gmail.com, ORCID 0000-0003-0153-5739.