

УДК 543.4:544.2

**Л. М. Юсупова, С. Ю. Гармонов, Р. Ш. Мархабуллина**

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСЕЙ В СУБСТАНЦИИ**

**5,7-БИС-(МЕТА-НИТРОФЕНИЛАМИНО)-4,6-ДИНИТРОБЕНЗОФУРОКСАНА**

*Ключевые слова: 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксан, стандартизация, высокоэффективная жидкостная хроматография.*

*Разработана методика количественного определения посторонних примесей в субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.*

*Key words: 5,7-bis-(meta-nitrophenylamino)-4,6-dinitrobenzofuroxan, standardization, high-performance liquid chromatography.*

*The technique of quantitative definition of strange impurities in the 5,7-bis-metanitrophenylamino-4,6-dinitrobenzofuroxan using by high-performance liquid chromatography method is developed.*

**Введение**

Бензофураксаны представляют собой соединения с широким спектром биологической активности. Доказана антигельминтная активность и низкая токсичность субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана [1, 2, 3]. В качестве примесей в субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана выступают исходные вещества: м-нитроанилина и 5,7-дихлор-4,6-динитробензофураксан. Наличие посторонних примесей в лекарственных средствах снижает их биологическую активность и уменьшает срок годности. Следовательно, целью исследования является разработка точного и надежного метода количественного определения посторонних примесей в субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии характеризуется высокой чувствительностью, точностью, универсальностью, экспрессностью.

**Экспериментальная часть**

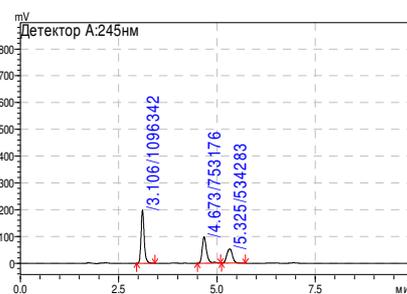
Количественное определение примесей в субстанции 5,7-дихлор-4,6-динитробензофураксана проводили на жидкостном хроматографе LC-20 фирмы "Schimadzu" (Япония) со спектрофотометрическим детектором. Для хроматографического разделения 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана, 5,7-дихлор-4,6-динитробензофураксана и м-нитроанилина экспериментально подобраны следующие условия: стальная колонка длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная сорбентом C18 с размером частиц 5 мкм (Symmetry C18), скорость подвижной фазы – 1 мл/мин, объем инжестируемой пробы – 20 мкл. Для обеспечения высокой чувствительности методики, анализ проводили при длине волны 245 нм, которая соответствует наиболее выраженному неспецифическому максимуму в УФ-спектре 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-

динитробензофураксана и его примесей. При проведении исследований влияния состава подвижной фазы на времена удерживания анализируемых компонентов подобрано оптимальное соотношение подвижной фазы: ацетонитрил и 0,1 % трифторуксусная кислота (70 % – 30 %) [4].

Для приготовления раствора 0,1 % трифторуксусной кислоты использовали сверхчистую воду, полученную на установке MilliporWaters.

Предварительно синтезируемая субстанция была очищена от примесей (мета-нитроанилин и 5,7-дихлор-4,6-динитробензофураксан) методом перекристаллизации в бинарной системе растворителей: этанол 96 % – ацетонитрил. Анализ очищенной субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана методом потенциометрического титрования показал содержание активного вещества 99,99 %.

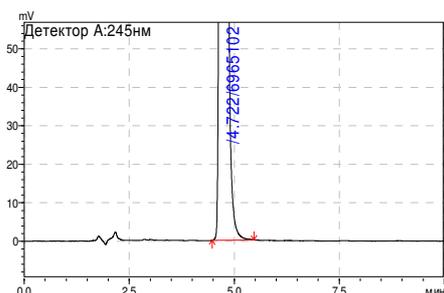
Для проверки пригодности хроматографической системы, была приготовлена смесь, состоящая из 1 мл мета-нитроанилина, 1 мл 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана и 1 мл 5,7-дихлор-4,6-динитробензофураксана с концентрациями 0,0001 мг/мл.



**Рис. 1 – Хроматограмма раствора для проверки пригодности хроматографической системы**

На рисунке 1 представлена хроматограмма раствора для проверки пригодности хроматографической системы. Время удерживания пика м-нитроанилина составило 3.11 мин, 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана –

4.67 мин, а 5,7-дихлор-4,6-динитробензофураксана – 5.33 мин. Эффективность колонки, рассчитанная по пику 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана, составило 9400 теоретических тарелок, по пику 5,7-дихлор-4,6-динитробензофураксана – 6900 теоретических тарелок, а по пику м-нитроанилина – 7800 теоретических тарелок. USP рекомендует для методики высокоэффективной жидкостной хроматографии значение количества теоретических тарелок по пику определяемого вещества не менее 2000 [5]. Коэффициент асимметрии пика мета-нитроанилина составил 1,17; 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана – 1,24; а 5,7-дихлор-4,6-динитробензофураксана – 1,0. Согласно требованиям Европейской фармакопеи, коэффициент асимметрии пика должен находиться в интервале от 0,8 до 1,5 [6]. Разрешение между пиками мета-нитроанилина и 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана, составило 9, а между пиками 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана и 5,7-дихлор-4,6-динитробензофураксана – 2,9. Разрешение между пиками определяемых веществ является важным показателем, характеризующим разделяющую способность хроматографической системы и правильность выбора условий хроматографирования. Британская и Европейская фармакопеи рекомендуют значение разрешения пиков  $R_s \geq 1,5$  [7].



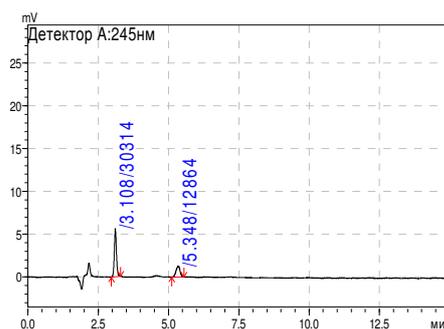
**Рис. 2 – Хроматограмма очищенной субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана с концентрацией 0,001 г/мл**

По 20 мкл раствора 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана вводили в хроматографическую колонку не менее пяти раз. Время выхода пика 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана составило 4.72 мин.

Для идентификации и определения времени выхода посторонних примесей: мета-нитроанилина и 5,7-дихлор-4,6-динитробензофураксана параллельно на их основе готовили раствор в ацетонитриле с концентрацией 0,25 мкг/мл. По 20 мкл раствора примесей мета-нитроанилина и 5,7-дихлор-4,6-динитробензофураксана вводили в хроматографическую колонку не менее пяти раз в вышеописанных условиях.

Анализ хроматограммы очищенной субстанции (рисунок 2) 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана по-

казал отсутствие сигналов мета-нитроанилина и 5,7-дихлор-4,6-динитробензофураксана.



**Рис. 3 – Хроматограмма раствора стандартного образца мета-нитроанилина и 5,7-дихлор-4,6-динитробензофураксана с концентрацией 0,25 мкг/мл**

Содержание мета-нитроанилина и 5,7-дихлор-4,6-динитробензофураксана в субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a_1 \cdot 100 \cdot 100} = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot P}{S_0 \cdot a_1 \cdot 10000}$$

где  $S_0$  – среднее значение площади пика соответствующей примеси, вычисленное по трем хроматограммам раствора стандартного образца;  $S_1$  – среднее значение площади пика соответствующей примеси, вычисленное по трем хроматограммам испытуемого раствора;  $a_1$  – навеска субстанции, в граммах;  $a_0$  – навеска мета-нитроанилина (5,7-дихлор-4,6-динитробензофураксана), взятая для приготовления стандартного раствора, в граммах;  $P$  – содержание основного вещества в стандартном образце примеси, в пересчете на безводное вещество, в процентах.

Суммарное содержание примесей (мета-нитроанилина и 5,7-дихлор-4,6-динитробензофураксана) в субстанции должно быть не более 0,5%.

## Результаты и их обсуждение

Для доказательства правильности и точности разработанной методики были приготовлены три модельных образца субстанции с заложенным содержанием примесей. Результаты анализа трех модельных образцов приведены в таблице 1 и 2.

Из таблицы 1 видно, что значение относительной погрешности среднего результата количественного определения примеси мета-нитроанилина в модельных образцах составило 1,84 % и не превышает 4 %.

Из таблицы 2 видно, что значение относительной погрешности среднего результата количественного определения примеси 5,7-дихлор-4,6-динитробензофураксана в модельных образцах составило 1,86 % и не превышает 4 %.

**Таблица 1 – Количественное определение метанитроанилина в модельном образце (n=9, P=0,95)**

Заложено, г	Найдено		Метрологи-ческие характеристики
	г	%	
0,0020	0,0020	100,00	n=9, f=8, P=95 % t (95 %, 8)=2,31 $\bar{x}$ =98,07 % s <sup>2</sup> =5,46 s=2,34 % RSD=2,39 % $\Delta \bar{x}$ =1,80 % $\epsilon$ =1,84 %
0,0020	0,0019	95,00	
0,0020	0,0019	95,00	
0,0025	0,0025	100,00	
0,0025	0,0024	96,00	
0,0025	0,0025	100,00	
0,0030	0,0030	100,00	
0,0030	0,0029	96,67	
0,0030	0,0030	100,00	

**Таблица 2 – Количественное определение 5,7-дихлор-4,6-динитробензофуросана в модельном образце (n=9, P=0,95)**

Заложено, г	Найдено		Метрологи-ческие характеристики
	г	%	
0,0020	0,0019	95,00	n=9, f=8, P=95 % t (95 %, 8)=2,31 $\bar{x}$ =97,63 % s <sup>2</sup> =5,32 s=2,31 % RSD=2,37% $\Delta \bar{x}$ =1,82 % $\epsilon$ =1,86 %
0,0020	0,0019	95,00	
0,0020	0,0020	100,00	
0,0025	0,0025	100,00	
0,0025	0,0024	96,00	
0,0025	0,0024	96,00	
0,0030	0,0029	96,67	
0,0030	0,0030	100,00	
0,0030	0,0030	100,00	

Следовательно, разработанная методика количественного определения примесей в субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофуросана методом высокоэффективной жидкост-

ной хроматографией характеризуется правильно-стью и точностью.

## Выводы

Разработана методика количественного определения посторонних примесей в субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофуросана методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии позволяет получить достоверные и надежные результаты, а также может быть использован для количественного определения примесей в субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофуросана.

## Литература

1. Пат. 2009112924/15(017596) от 5. 05.2010 г. Антигельминтная композиция на основе соли четвертичного фосфония и замещенного динитробензофуросана. И.В. Галкина, С.Н. Егорова, Л.М. Юсупова, Р.Ф. Мавлиханов, Н.А. Лутфуллина, Н.В. Воробьева, Е.В. Тудрий, Л.В. Спатлова, Ю.Г.Штырлин, В.И. Галкин, М.Х. Лутфуллин.
2. Л.М. Юсупова, С.Ю. Гармонов, И.М. Захаров, А.Р. Быков, Т.В. Гарипов, И.Ф. Фаляхов. Средства биологической защиты многоцелевого назначения на основе хлорпроизводных нитробензофуросана. Вестн. Казан. технол. ун-та. №1, с. 103-111, 2004.
3. Л.В. Спатлова, Л.М. Юсупова. Кинетика взаимодействия 5,7-дихлоро-4,6-динитробензофуросана с 3,5 дихлороанилином. Вестн. Казан. технол. ун-та. №19, с. 29-34, 2011.
4. Салахов И.А. Унифицированные подходы к анализу метаболитов, химиотерапевтических, анальгезирующих и противовоспалительных лекарственных средств методом ВЭЖХ: Автореф. дис. канд. хим. наук. - Казань, 2010. -25 с.
5. United States Pharmacopoeia (2007).
6. European Pharmacopoeia (2007).
7. British Pharmacopoeia (2007).