

**РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ  
СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОМПЛЕКСА  
СЕРЕБРА (I) С 2-(4,6-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛ-2,3-  
ДИГИДРОКСИФЕНИЛСУЛЬФАНИЛ)УКСУСНОЙ  
КИСЛОТОЙ В АЦЕТОНИТРИЛЕ**

**Стахевич С.И., Горбацевич Г.И.**

*Белорусский государственный медицинский университет,  
кафедра фармацевтической химии, г. Минск*

**Ключевые слова:** абсорбционная спектрофотометрия, валидация, комплекс серебра(I).

**Резюме:** В работе представлена методика количественного определения комплекса серебра (I) с 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил)уксусной кислотой методом абсорбционной спектрофотометрии в ацетонитриле. Проведена ее валидация, показана приемлемая линейность, правильность, сходимостъ и робастность.

**Resume:** The assay technique of Ag(I) complex with 2-(4,6-di-tert-butyl-2,3-dihydroxyphenylsulfanyl)acetic acid by the absorption spectrophotometry method in acetonitrile is presented in the article. It was shown that this method has admissible linearity, accuracy, precision and robustness.

**Актуальность.** Проблема увеличения количества резистентных бактерий, вирусов и грибов к применяемым химиотерапевтическим средствам уже приняла глобальный характер, что в свою очередь ставит под угрозу рациональную фармакотерапия инфекционных заболеваний. Без эффективных противомикробных лекарственных средств многие стандартные методы лечения могут стать безрезультатными или превратятся в крайне рискованные процедуры. Поэтому возникает необходимость в разработке новых антимикробных агентов, среди которых необходимо отметить координационные соединения Ag(I). Установлено, что комплексообразование с ионами серебра (I) биоактивных органических соединений позволяет преодолеть выявленную пока лишь в редких случаях резистентность микроорганизмов по отношению к серебру [1], способствует расширению спектра антимикробной активности и снижению токсичности неорганических солей металлов [2]. На сегодняшний день в химиотерапии инфекций используется лишь несколько серебросодержащих субстанций: колларгол, протаргол, сульфадiazин серебра, сульфатиазол серебра. В связи с этим использование комплекса серебра (I) с 2-(4,6-ди-трет-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил)уксусной кислотой ( $AgL_2$ ) в качестве антимикробного средства представляется весьма перспективным, так как соединение проявляет высокую активность (МИК < 1,5 мкг/мл) в отношении грамотрицательных (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), грамположительных бактерий (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*), дрожжевых (*Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus laurentiive*, *Candida spp.*) и плесневых грибов (*Aspergillus niger*, *Fusarium spp.*, *Penicillium lividum*) и имеет низкую токсичность ( $LD_{50} > 1000$  мг/кг) [3, 4].

Необходимым этапом разработки лекарственного средства является выбор и валидация методики его анализа, в частности количественного определения.

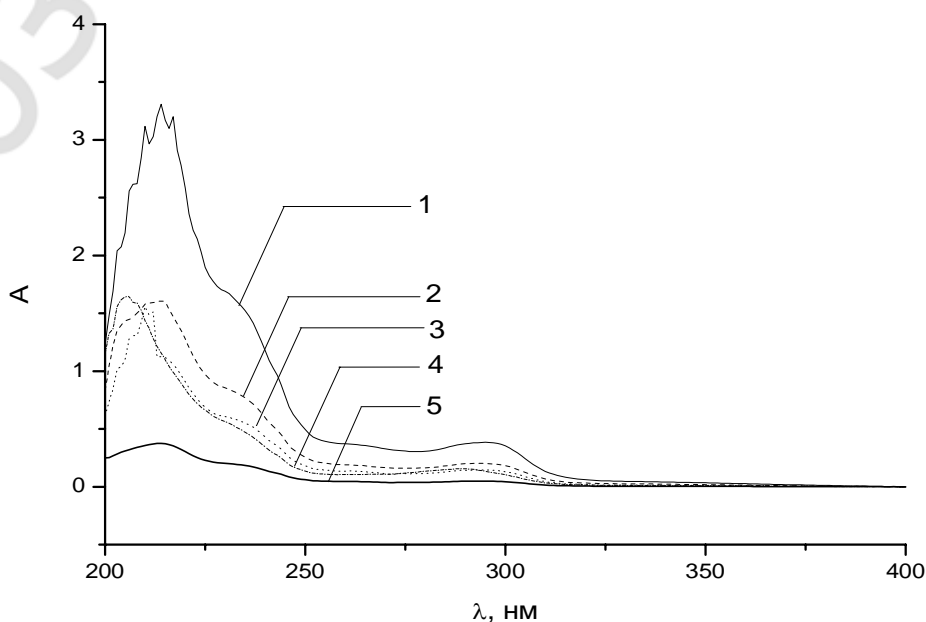
**Цель:** разработать методику количественного определения  $AgL_2$  методом абсорбционной спектрофотометрии.

**Задачи:** 1. Подобрать оптимальные условия для проведения спектрофотометрического определения  $AgL_2$ ; 2. Провести валидацию аналитической методики по показателям специфичности, линейности, правильности, сходимости и робастности.

**Материал и методы.** Исследования выполняли на спектрофотометре Solar PB2201. Взвешивание точных навесок проводили на аналитических весах ВЛА-200г-М. Обработку результатов осуществляли в компьютерной программе OriginPro 9.0.

В качестве растворителя для проведения спектрофотометрического определения субстанции использовали ацетонитрил квалификации «для ВЭЖХ» (Acetonitrile gradient grade for liquid chromatography, Merck). Навеску испытуемого образца  $AgL_2$  растворяли в ацетонитриле и доводили до 50,0 мл (*раствор А*). Затем 0,25 мл *раствора А* доводили ацетонитрилом до 50,0 мл (*раствор В*). Спектр поглощения *раствора В* регистрировали в диапазоне 200–400 нм с шагом 1 нм, помещая раствор в кварцевую кювету с толщиной слоя 1,0 см, определяли оптическую плотность на длине волны 310 нм. В качестве раствора сравнения использовали ацетонитрил.

Для построения градуировочной прямой готовили растворы стандартных образцов  $AgL_2$  в ацетонитриле по вышеописанной схеме с концентрациями 0,0200 мг/мл, 0,0100 мг/мл, 0,0075 мг/мл, 0,0050 мг/мл, 0,0025 мг/мл, снимали спектры поглощения растворов в диапазоне 200–400 нм с шагом 1 нм (рисунок 1) и определяли оптическую плотность на длине волны 310 нм. Рассчитывали содержание  $AgL_2$  в испытуемом образце по градуировочному графику.



**Рис. 1** – Спектры поглощения растворов стандартных образцов  $AgL_2$  в ацетонитриле (1 – 0,02 мг/мл, 2 – 0,01 мг/мл, 3 – 0,0075 мг/мл, 4 – 0,005 мг/мл, 5 – 0,0025 мг/мл)

**Результаты и их обсуждение.** При разработке методики фотометрического определения субстанции важное значение имеет выбор растворителя. Ранее было

установлено, что  $AgL_2$  является комплексом с частичным переносом заряда, относящимся к особому классу соединений переходных металлов с редокс-активными лигандами, в которых наблюдается внутримолекулярный электронный переход между лигандом и ионом металла (валентный таутомеризм или частичный перенос заряда) [5]. В этих комплексах лиганд частично представлен семихиноновой формой. В растворителях с высокой сольватирующей способностью для комплекса  $AgL_2$  реализуется внутримолекулярный редокс-процесс, в результате которого происходит восстановление серебра. Таким образом, для количественного определения непригодны растворители с высокими значениями диэлектрической проницаемости и донорных чисел (этанол, ацетон, ТГФ, ДМСО, ДМФА). В предлагаемой методике в качестве растворителя был выбран ацетонитрил ввиду низкой сольватирующей способности ( $DN=14,1$  ккал/моль,  $\epsilon = 38,0$  при  $25^\circ C$ ) и высокой растворимости в нем определяемого вещества.

Анализ спектров поглощения  $AgL_2$  показал, что с ростом концентрации растворенного вещества наблюдается небольшое батохромное смещение его максимумов поглощения (рисунок 1). В связи с этим измерение оптической плотности растворов проводили при длине волны 310 нм, находящейся на плече полосы переноса заряда  $O_{phen} \rightarrow Ag(I)$ , что обеспечивало большую точность измерений при различных концентрациях.

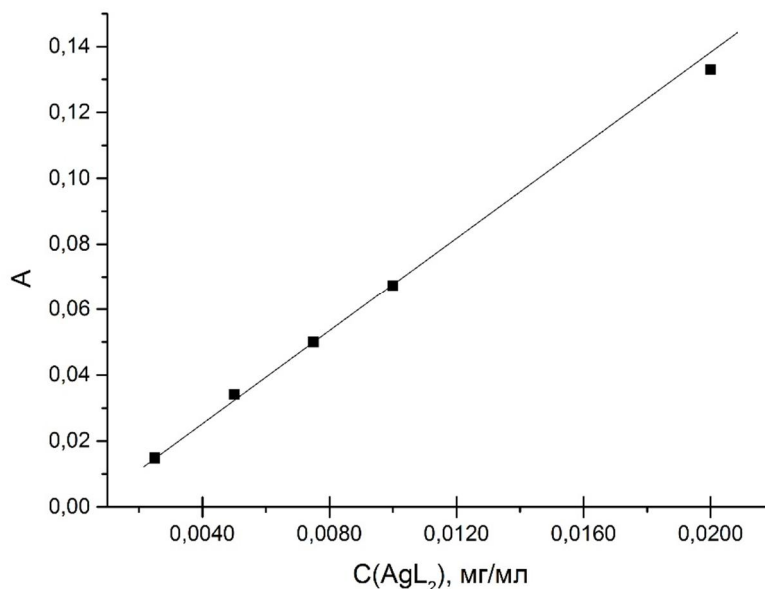
Специфичность методики считается доказанной, если ни растворитель, ни компоненты плацебо не искажают результат. Для этого снимали спектры поглощения растворов стандартного образца  $AgL_2$ , лиганда, а также растворителя (ацетонитрила). Спектр поглощения комплекса значительно отличался от спектра ацетонитрила, однако, практически совпадал со спектром лиганда, что свидетельствует о невысокой специфичности методики при наличии примесей лиганда и продуктов его окисления в анализируемой субстанции. Решением проблемы может быть сочетание предложенного метода с определением содержания серебра в образце.

Линейность методики контролировали на пяти уровнях концентраций  $AgL_2$ : 0,0025 мг/мл, 0,0050 мг/мл, 0,0075 мг/мл, 0,0100 мг/мл, 0,0200 мг/мл Коэффициент корреляции составил 0,9998. Уравнение зависимости оптической плотности раствора  $AgL_2$  от концентрации имеет вид  $y = 6,7004x - 0,0004$ . Поэтому интервал 0,0025-0,0200 мг/мл можно определить как аналитическую область методики. Линейность методики количественного определения комплекса представлена на рисунке 2.

Правильность устанавливали на стандартных образцах  $AgL_2$  по трем испытаниям образца на трех разных уровнях (концентрациях). Критерий приемлемости – средний процент восстановления при использовании растворов заданных концентраций, скорректированный на 100 %. Процент восстановления находится в области от 96,12 до 104,04 %, его средняя величина составила 100,13 % (таблица 1).

**Таблица 1** – Оценка правильности методики

Введено, мг/мл	0,0200			0,0050			0,0025		
Найдено, мг/мл	0,0199	0,0205	0,0205	0,0051	0,0049	0,0050	0,0024	0,0026	0,0024
% восстановления	99,85	102,50	100,95	102,68	98,00	100,00	97,31	104,04	96,12



**Рис. 2** – Зависимость оптической плотности раствора от концентрации стандартного образца AgL<sub>2</sub>

Сходимость была доказана на основании испытаний 6 проб AgL<sub>2</sub>. Критерий приемлемости выражается величиной относительного стандартного отклонения, которое не должно превышать 10 %. Среднее его значение составило 3,75 %, что указывает на прецизионность методики в условиях воспроизводимости (таблица 2).

**Таблица 2** – Оценка сходимости методики

Введено, мг/мл	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0		
Найдено, мг/мл	5,1	4,9	5,0	4,7	5,1	5,2		
Метрологическая характеристика								
$\bar{x}$	$S^2$	S	$S_{\bar{x}}$	P	t(P,v)	$\Delta\bar{x}$	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$	$\bar{\epsilon}, \%$
5,0	0,03200	0,17889	0,07303	0,95	2,57	0,2	5,0±0,2	3,75

**Выводы:**

1. Спектрофотометрическое определение содержания AgL<sub>2</sub> целесообразно проводить при длине волны 310 нм, используя в качестве растворителя ацетонитрил;
2. В диапазоне концентраций AgL<sub>2</sub> 0,0025–0,0200 мг/мл методика имеет приемлемую линейность, правильность и сходимость, надежная специфичность и робастность выполняется при соблюдении дополнительных условий.

**Литература**

1. Percival S.L., Bowler P.G., Russel D. Bacterial resistance to silver in wound care // Journal of Hospital Infection. – 2005. – Vol. 60. – P. 1–7.
2. Sadler P.J. Inorganic chemistry and drug design // Advances in Inorganic Chemistry. – 1991. – Vol. 36. – P. 18.
3. Серебросодержащий антимикробный агент широкого спектра действия с антигерпетической активностью: пат. 15000 Респ. Беларусь, МПК А 61К 31/192, А 61К 31/28, А 61Р 31/04, А 61Р 31/10, А 61Р 31/22 / Е.И. Бореко, Т.В. Ковальчук, Н.В. Логинова, Г.И. Полозов, О.И. Шадыро, А.А.

Чернявская; заявитель Учреждение Белорусского государственного университета «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем» – № а 20090920; заявл. 23.06.09; опубл. 28.02.11.

4. Серебросодержащий антифунгальный агент широкого спектра действия: пат. 17021 Респ. Беларусь; МПК А 61К 31/192, А 61К 31/28, А 61Р 31/10 / Н.В. Логинова, А.А. Чернявская, Н.П. Осипович, Т.В. Ковальчук, Г.И. Полозов, О.И. Шадыро; заявитель Учреждение Белорусского государственного университета «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем» – № а 20110726; заявл. 27.05.11; опубл. 30.12.12.

5. Complex of silver(I) with 2-[4,6-di(tert-butyl)-2,3-dihydroxyphenylsulfanyl]-acetic acid as a precursor of silver nanoparticles / N.V. Loginova, A.A. Chernyavskaya, M.S. Parfenova, N.P. Osipovich, G.I. Polozov, Yu.A. Fedutik, T.V. Koval'chuk, G.P. Shevchenko // Polyhedron. – 2006. – Vol. 25. – P. 1723–1728.