

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБСТАНЦИИ НОВОГО БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО СОЕДИНЕНИЯ ПРОИЗВОДНОГО ХИНАЗОЛИН-4(3H)-ОНА

Д. С. Волокитина², А. А. Озеров¹, Д. С. Лазарян², С. В. Волокитин²

¹Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра фармацевтической и токсикологической химии,

²Пятигорский медико-фармацевтический институт — филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России,
кафедра фармацевтической и токсикологической химии

В настоящей работе изучена возможность использования спектрофотометрии в УФ-области для количественного определения субстанции нового биологически активного соединения производного хиназолин-4(3H)-она. Разработана методика определения и проведена ее валидационная оценка. Методика соответствует требованиям, предъявляемым к методикам анализа фармацевтических субстанций.

Ключевые слова: производное хиназолина, количественное определение, спектрофотометрия, валидация, критерии приемлемости.

DOI 10.19163/1994-9480-2017-2(62)-84-35-38

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE SPECTROPHOTOMETRIC TECHNIQUE FOR QUANTITATIVE ANALYSIS OF A NEW BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUND, A DERIVATIVE OF-4 (3H)-ONE QUINAZOLINE

D. S. Volokitina, A. A. Ozerov, D. S. Lazaryan, S. V. Volokitin

¹Volgograd State Medical University, Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry,

²Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute — affiliate of the Volgograd State Medical University,
Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry

In this study, we investigated the possibility of using UV spectrophotometry to quantify of a new substance, a bioactive compound derived from -4(3H)-one quinazolin. A new analytical technique was developed and validated. The technique meets the requirements for the analytical procedures for pharmaceutical substances.

Key words: quinazoline derivative, quantification, spectrophotometry, validation, eligibility criteria.

Новое биологически активное соединение — производное хиназолин-4(3H)-она 3-[2-(2-метилфениламино)-2-оксоэтил]-хиназолин-4(3H)-он (лабораторный шифр VMA-10-13) синтезировано на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Волгоградского государственного медицинского университета. Предварительные доклинические исследования показали перспективность его применения в медицинской практике в качестве ноотропного и противогипоксического лекарственного средства [3, 4], что требует глубокого исследования физико-химических свойств этого соединения, а также выбора и обоснования методов анализа и контроля качества.

Современный фармацевтический анализ характеризуется широким применением физико-химических методов, среди которых спектрофотометрия в УФ-области является одним из самых простых и доступных.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение возможности использования спектрофотометрии в УФ-области для количественного определения субстанции VMA-10-13, разработка методики, определение ее валидационных характеристик и соответствия их критериям приемлемости [2, 5].

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

При разработке методики и изучении валидационных характеристик было использовано аналитическое оборудование: спектрофотометр СФ-104 (с использованием сервисного пакета программ «UVWin5»), весы аналитические ВЛ-124, а также мерная посуда 1 класса точности.

В качестве объекта исследования использовались перекристаллизованные и хроматографически очищенные образцы субстанции VMA-10-13 [4]. При выборе растворителя учитывали растворимость субстанции и устойчивость полученных растворов, а также доступность растворителя. В качестве растворителя был выбран этанол 96%-й.

Методика количественного определения.

Около 0,05 г субстанции (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл этанола 96%-го, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. 0,5 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора до метки этанолом 96%-м и перемешивают.

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 265 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют этанол 96%-й.

Содержание VMA-10-13 в субстанции в процентах (X) вычисляются по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 50}{A_{см}^{1\%} \cdot a \cdot 0,5}$$

где: A — оптическая плотность испытуемого раствора;

a — навеска субстанции, г;

$A_{см}^{1\%}$ — удельный показатель поглощения VMA-10-13 при длине волны 265 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спектр VMA-10-13 в ультрафиолетовой области от 220 до 280 нм, представленный на рис., имеет две полосы поглощения с максимумами при 226 и 265 нм.

Наиболее подходящей для количественного определения VMA-10-13 является вторая полоса поглощения, так как она находится в сравнительно селективной области спектра и является более пологой по сравнению с полосой с максимумом при 226 нм [1]. В то же время полоса поглощения при 226 нм характеризуется большим удельным поглощением, что должно обеспечивать большую чувствительность методики.

Нами была изучена зависимость между оптической плотностью и концентрацией раствора в области концентраций 0,5—3,5 мг/100 мл (для длины волны 265 нм) и 0,125—0,85 мг/100 мл (для длины волны 226 нм). Результаты определения подчиненности растворов субстанции VMA-10-13 основному закону светопоглощения

и рассчитанные значения удельного показателя поглощения приведены в табл. 1.

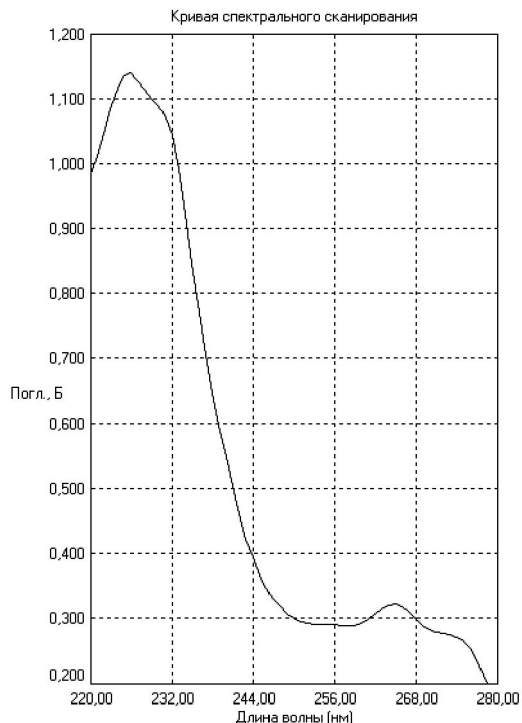


Рис. Спектр поглощения раствора VMA-10-13 в этаноле 96%-м

Методом наименьших квадратов были рассчитаны параметры линейной зависимости: угловой

Таблица 1

Определение подчиненности раствора субстанции VMA-10-13 основному закону светопоглощения и значения удельного показателя поглощения

226 нм		265 нм		Удельный показатель поглощения, $A_{1см}^{1\%}$	
Концентрация, мг/100 мл (x_i)	Оптическая плотность, A (y_i)	Концентрация, мг/100 мл (x_i)	Оптическая плотность, A (y_i)	226 нм	265 нм
0,124	0,145	0,495	0,165	1171,7	333,3
0,248	0,285	0,990	0,323	1151,5	326,3
0,371	0,430	1,485	0,498	1158,2	335,4
0,495	0,565	1,980	0,679	1141,4	342,9
0,619	0,659	2,475	0,828	1065,1	334,5
0,743	0,730	2,970	0,994	983,2	334,7
0,866	0,870	3,465	1,159	1004,3	334,5
Параметры линейной зависимости $y = bx + a$				Метрологическая характеристика результатов определения $A_{1см}^{1\%}$	
226 нм		265 нм		226 нм	265 нм
$b = 0,9506$		$b = 0,3358$		$\bar{x} = 1096,5$	$\bar{x} = 334,5$
$s_b = 0,0438$		$s_b = 0,0031$		$s = 78,36$	$s = 4,85$
$\Delta b = 0,1124$		$\Delta b = 0,0079$		$s_{\bar{x}} = 29,62$	$s_{\bar{x}} = 1,83$
$a = 0,0557$		$a = -0,0011$		$\Delta x = 72,5$	$\Delta x = 4,5$
$s_a = 0,0242$		$s_a = 0,0068$		$\bar{\epsilon} = 6,61\%$	$\bar{\epsilon} = 1,34\%$
$\Delta a = 0,0622$		$\Delta a = 0,0174$		$A_{1см}^{1\%} = 1096,5 \pm 72,5$	$A_{1см}^{1\%} = 334,5 \pm 4,5$
$s_o = 0,0286$		$s_o = 0,0080$			
$r = 0,9947$		$r = 0,9998$			
$y = 0,9506x + 0,0557$		$y = 0,3358x - 0,0011$			

коэффициент и свободный член, их стандартные отклонения и полуширины доверительных интервалов, остаточное стандартное отклонение, коэффициент корреляции.

Критерии приемлемости параметров линейной зависимости, принятые согласно рекомендациям [5], приведены в табл. 2.

Таблица 2

Критерии приемлемости параметров линейной зависимости $y = bx + a$

Требования для субстанции ($B = \pm 2\%$)		Полученные значения	Вывод
226 нм	$ a \leq \Delta a = t(95\%, n-2) \cdot s_a$	$0,1110 < 0,1246$	выполняется
	$r \geq 0,997$	$0,9947 < 0,997$	не выполняется
265 нм	$ a \leq \Delta a = t(95\%, n-2) \cdot s_a$	$0,0011 < 0,0174$	выполняется
	$r \geq 0,997$	$0,9998 > 0,997$	выполняется

Выполнение неравенства: свободный член уравнения линейной зависимости меньше или равен его доверительному интервалу ($a \leq \Delta a = t(95\%; 5) \cdot s_a$) доказывает отсутствие систематической погрешности метода при обеих длинах волн. Коэффициент корреляции (r) является показателем жесткости линейной связи между величинами x и y , то есть чем ближе его абсолютная величина $|r|$ к единице, тем менее случайна наблюдаемая линейная зависимость. Согласно требованиям [5], для аналитических целей используют линейную зависимость с коэффициентом корреляции $r \geq 0,997$. Данное требование выполняется для длины волны 265 нм и не выполняется для 226 нм.

Таким образом, рассчитанные значения параметров линейной зависимости в диапазоне концентраций от 0,5 до 3,5 мг/100 мл, соответствуют критериям при-

емлемости для длины волны $\lambda = 265$ нм. Поэтому в качестве рабочей длины волны для количественного определения нами была выбрана длина волны 265 нм.

Руководствуясь принципом параллельного определения валидационных характеристик прецизионность (сходимость) и правильность методики оценивали одновременно для девяти модельных образцов в интервале концентраций 80—120 %. Расчет содержания проводили по удельному показателю поглощения субстанции VMA-10-13.

Сходимость и правильность методики определяли по рассчитанным значениям среднего (Z), стандартного отклонения RSD , относительного доверительного интервала (ΔZ) и систематической погрешности (δ), которые приведены в табл. 3.

Правильность методики оценивали по критериям статистической и практической незначимости. Расчет выполнения критериев правильности и прецизионности приведен в табл. 4. Как следует из данных таблицы, спектрофотометрическая методика количественного определения субстанции VMA-10-13 для субстанций с допусками содержания основного вещества ($B \pm 2\%$) ($maxDAs = 2,0\%$) не имеет статистически значимой систематической погрешности, характеризуется достаточной прецизионностью и является корректной. В то же время для субстанций с допуском содержания основного вещества ($B \pm 1\%$) данный метод не может быть использован из-за очень малого значения допустимой неопределенности анализа ($maxDAs$), которая составляет 1,0 %.

Также при разработке методики нами были исследованы факторы, которые влияют на результаты анализа, таким образом, проводилась оценка робастности методики. При изучении стабильности растворов во времени определено, что оптическая плотность растворов остается стабильной в течение 24 ч.

Таблица 3

Определение параметров правильности и прецизионности методики на модельных растворах субстанции VMA-10-13

Уровень	№	Навеска, мг (X_i)	Оптическая плотность, (A_i)	Найдено, мг (Y_i)	Найдено, % ($Z = Y_i / 100 X_i$)
1	1	39,1	0,260	38,9	99,40
	2	40,3	0,269	40,2	99,77
	3	40,7	0,274	41,0	100,63
2	4	49,3	0,328	49,0	99,45
	5	50,1	0,332	49,6	99,05
	6	50,9	0,342	51,1	100,43
3	7	59,5	0,397	59,3	99,73
	8	60,5	0,407	60,8	100,56
	9	61,1	0,405	60,5	99,08
Среднее, \bar{Z} (%)					99,79
Стандартное отклонение, S					0,62
Относительное стандартное отклонение, RSD_z (%)					0,62
Относительный доверительный интервал, $\Delta Z = t(95\%, n-1) RSD_z$					1,42
Систематическая погрешность, $\delta = Z - 100 $					0,21
Критерий статистической незначимости, $\Delta Z/3$					0,47

Выполнение критериев правильности и прецизионности методики

Критерии правильности				
Допуск содержания, В%	$\delta = \bar{Z} - 100 $	Критерий статистической незначимости $\delta < (\Delta Z / \sqrt{9})$	Критерий практической незначимости $\delta < (0,32 \cdot \max \Delta A_s)$	Вывод
± 1%	0,21	0,21 < 0,47	0,21 < 0,32	соответствует
± 2%	0,21	0,21 < 0,47	0,21 < 0,64	соответствует
Критерий прецизионности				
Допуск содержания, В%	ΔZ	Требования критерия $\Delta Z \leq \max \Delta A_s$		Вывод
± 1%	1,42	1,42 > 1,0		не соответствует
± 2%	1,42	1,42 < 2,0		соответствует

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана спектрофотометрическая методика количественного определения основного вещества в субстанции VMA-10-13. Валидационные параметры

разработанной методики соответствуют критериям пригодности. Методика может быть использована для количественного определения субстанции с допусками содержания основного вещества от 98,0 до 102,0 %.

ЛИТЕРАТУРА

1. Булатов М. И. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа. — 5-е изд. / Булатов М. И., Калинин И. П. — Л.: Химия, 1986. — 432 с.
2. Государственная Фармакопея Российской Федерации. Изд. XIII. Т. 1. — М., 2015. — Режим доступа: <http://feml.scsml.rssi.ru/feml>.
3. Ноотропная активность амидов хиназолинового ряда / И. Н. Тюренков, А. А. Озеров, Е. Н. Шматова и др. // Хим.-фармац. журн. — 2015. — Т. 49, № 2. — С. 18—20.
4. Производные хиназолина, обладающие ноотропной и антигипоксической активностью: патент России № 2507198, заявка № 2012138665/04; заявл. 10.09.2012; опубл. 20.02.2014, Бюлл. № 5. — 12 с.
5. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности: Методические рекомендации. — М.: «Спорт и культура-2000», 2007. — 192 с.

REFERENCES

1. Bulatov M. I. Prakticheskoe rukovodstvo po fotometricheskim metodam analiza. — 5-e izd. / Bulatov M. I., Kalinkin I. P. — L.: Himija, 1986. — 432 s.
2. Gosudarstvennaja Farmakopeja Rossijskoj Federacii. Izd. XIII. T. 1. — M., 2015. — Rezhim dostupa: <http://feml.scsml.rssi.ru/feml>.
3. Nootropnaja aktivnost' amidov hinazolinovogo rjada / I. N. Tjurenkov, A. A. Ozerov, E. N. Shmatova i dr. // Him.-farmac. zhurn. — 2015. — T. 49, № 2. — S. 18—20.
4. Proizvodnye hinazolina, obladajushhie nootropnoj i antigipoksicheskoj aktivnost'ju: patent Rossii № 2507198, zajavka № 2012138665/04; zajavl. 10.09.2012; opubl. 20.02.2014, Bjull. № 5. — 12 s.
5. Rukovodstvo dlja predpriyatij farmacevticheskoj promyshlennosti: Metodicheskie rekomendacii. — M.: «Sport i kul'tura-2000», 2007. — 192 s.

Контактная информация

Волокитина Дарья Сергеевна — аспирант, Пятигорский медико-фармацевтический институт — филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, кафедра фармацевтической и токсикологической химии, e-mail: daria132009@rambler.ru