

Разработка и валидация методики количественного определения новой субстанции

Е.С. Мищенко¹, Д.С. Лазарян¹, А.А. Озеров²

¹Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал Волгоградского государственного медицинского университета; Российская Федерация, 357532, Пятигорск, пр. Калинина, д. 11;

²Волгоградский государственный медицинский университет; Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Павших борцов, д. 1

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Мищенко Екатерина Сергеевна – аспирант кафедры фармацевтической и токсикологической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолГМУ. Тел.: +7 (938) 332-32-93. E-mail:ekaterina-mischenko1809@mail.ru

Лазарян Джон Седракович – заведующий кафедрой фармацевтической и токсикологической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолГМУ, доктор фармацевтических наук, профессор. Тел.: +7 (928) 305-80-69. E-mail:j.s.lazaryan@pmedpharm.ru

Озеров Александр Александрович – заведующий кафедрой фармацевтической и токсикологической химии ВолГМУ, доктор химических наук, профессор. Тел.: +7 (8442) 94-39-00. E-mail: prof_ozеров@yahoo.com

РЕЗЮМЕ

Введение. В Волгоградском ГМУ осуществлен синтез новой субстанции из класса ацетанилидных производных хиназолин-4(3Н)-она (лабораторный шифр VMA-10-18). Результаты предварительного фармакологического исследования показали, что данное соединение характеризуется оригинальным спектром психотропного действия. Субстанция обладает слабыми основными свойствами и очень мало растворима в воде, для ее количественного определения целесообразно использовать метод кислотно-основного титрования в неводных средах.

Цель работы – разработка и валидация методики количественного определения новой субстанции VMA-10-18.

Материал и методы. Объект исследования – стандартный образец новой субстанции VMA-10-18. В работе использовалась мерная посуда класса А. В качестве растворителей применяли муравьиную кислоту, уксусную кислоту и уксусный ангидрид, в качестве титранта – 0,1М раствор хлорной кислоты, индикатора – 0,1 % раствор кристаллического фиолетового. Валидацию методики проводили согласно требованиям Государственной фармакопеи XIV издания (ГФ РФ XIV).

Результаты. Установлены оптимальные условия титриметрического определения субстанции, производной хиназолин-4(3Н)-она. Проведена валидация методики по показателям специфичность, линейность, аналитическая область, прецизионность и правильность.

Заключение. Разработанная методика количественного определения новой субстанции, производной хиназолин-4(3Н)-она валидна и может быть использована при проведении контроля качества.

Ключевые слова: хиназолин-4(3Н)-он, VMA-10-18, кислотно-основное титрование, муравьиная кислота, ледяная уксусная кислота, уксусный ангидрид, валидация.

Для цитирования: Мищенко Е.С., Лазарян Д.С., Озеров А.А. Разработка и валидация методики количественного определения новой субстанции. Фармация, 2019; 68 (7): 11–15. <https://doi.org/10.29296/25419218-2019-07-02>

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A PROCEDURE FOR ASSAY OF A NEW SUBSTANCE

E.S. Mishchenko¹, D.S. Lazaryan¹, A.A. Ozerov²

¹Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, Branch, Volgograd State Medical University, 11, Kalinin Pr., Pyatigorsk 357532, Russian Federation;

²Volgograd State Medical University, 1, Pavshikh Bortsov St., Volgograd 400131, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Mishchenko Ekaterina Sergeevna – a graduate student of the Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry of the Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, branch of the Volgograd State Medical University (Volg.SMU). Tel.: +7 (938) 332-32-93. E-mail: ekaterina-mischenko1809@mail.ru

Lazaryan John Sedrakovich – Head of the Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry of the Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, branch of the Volg.SMU, Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor. Tel.: +7 (928) 305-80-69. E-mail: j.s.lazaryan@pmedpharm.ru

Ozerov Alexander Aleksandrovich – Head of the Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry of the Volg.SMU, Doctor of Chemical Sciences, Professor. Tel.: +7 (8442) 94-39-00. E-mail: prof_ozеров@yahoo.com

SUMMARY

Introduction. The Volgograd State Medical University synthesized a new substance from the class of acetanilide derivatives of quinazolin-4(3H)-one (Laboratory Code VMA-10-1). The results of a preliminary pharmacological assay showed that this compound is characterized by an original spectrum of psychotropic activity. The substance has weak basic properties and is very slightly soluble in water; it is advisable to use an acid-base titration assay in the non-aqueous media for quantification of the substance.

Objective: to develop and validate a procedure for assay of the new substance VMA-10-18.

Material and methods. The investigation object was the standard sample of the new substance VMA-10-18. Class A volumetric glassware was used in the investigation. The investigators employed formic acid, acetic acid, and acetic anhydride as solvents, 0.1 M perchloric acid as a titrant, and 0.1% crystal violet solution as an indicator. The procedure was validated in accordance with the requirements of the 14th edition of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation.

Results. The optimal conditions were established for the titrimetric analysis of the substance derived from quinazolin-4(3H)-one. The analytical procedure was validated in terms of specificity, linearity, analytical area, precision, and accuracy.

Conclusion. The developed procedure for assaying the new substance, a quinazolin-4(3H)-one derivative, is valid and can be used in quality control.

Key words: quinazolin-4(3H)-one, VMA-10-18, acid-base titration, formic acid, glacial acetic acid, acetic anhydride, validation.

For citation: Mishchenko E.S., Lazaryan D.S., Ozerov A.A. Development and validation of a procedure for assay of a new substance. Farmatsiya (Pharmacy), 2019; 68 (7): 11–15. <https://doi.org/10.29296/25419218-2019-07-02>

Введение

На кафедре фармацевтической и токсикологической химии Волгоградского государственного медицинского университета был осуществлен синтез новой субстанции, относящейся к классу ацетанилидных производных хиназолин-4(3H)-она, под лабораторным шифром VMA-10-18. Химическая формула данного хиназолинового соединения: 3-[2-(4-метоксифениламино)-2оксоэтил]-хиназолин-4(3H)-она. Предварительные фармакологические исследования показали, что данное соединение обладает оригинальным спектром психотропного действия, а именно антидепрессивной, анксиолитической и ноотропной активностью [1].

Наличие анксиолитического и антидепрессивного действия расширяет терапевтический потенциал новой субстанции, так как тревожно-депрессивные состояния почти постоянно присутствуют у больных, страдающих хроническими нарушениями мозгового кровообращения. Не менее важны и его ноотропные свойства, поскольку у больных с нарушениями мозгового кровообращения в большей или меньшей степени обычно наблюдаются когнитивные нарушения [2–5].

Важным этапом в жизненном цикле данной субстанции является разработка способов контроля качества, определяющих его дальнейшее применение в медицинской практике [6]. Так как данная субстанция обладает слабыми основными

свойствами и очень мало растворима в воде, для ее количественного определения целесообразно использовать метод кислотно-основного титрования в неводных средах

Цель настоящей работы – разработка и валидация методики количественного определения новой субстанции VMA-10-18.

Материал и методы

Объект исследования – новая субстанция 3-[2-(4-метоксифениламино)-2оксоэтил]-хиназолин-4(3H)-она (VMA-10-18). Она представляет собой белый кристаллический порошок без запаха, очень мало растворимый в воде, растворимый в диметилсульфоксиде, умеренно растворимый в спирте этиловом 95%, практически не растворимый в хлороформе и эфире.

При разработке методики растворителями служили муравьиная и уксусная кислоты и уксусный ангидрид. Титрантом выступал 0,1М раствор хлорной кислоты, индикатор – 0,1% раствор кристаллического фиолетового [7].

Для приготовления раствора рабочего стандартного образца (СО) около 0,2 г (точная навеска) СО субстанции VMA-10-18 вносили в коническую колбу объемом 100 мл, прибавляли 35 мл смеси соответствующих растворителей (5 мл муравьиной кислоты и 30 мл растворителя) и титровали 0,1М раствором хлорной кислоты до ярко-голубого окрашивания (индикатор – 0,5 мл 0,1% раствора кристаллического фиолетового

го). Параллельно проводили контрольный опыт. 1 мл 0,1М раствора хлорной кислоты соответствует 29,33 мг $C_{17}H_{15}N_3O_3$.

Содержание действующего вещества (X,%) в субстанции определяли по формуле:

$$X = \frac{(V - V_i) \cdot K \cdot T \cdot 100\%}{a \cdot 1000},$$

где V – объем 0,1М хлорной кислоты, пошедшей на титрование раствора СО, мл; V_i – объем титранта, мл; K – поправочный коэффициент титрованного раствора; T – титр титранта, мг/мл; а – навеска СО, г.

Валидацию разрабатываемой методики проводили в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методов» ГФ РФ XIV [7].

Для оценки валидности методики количественного определения стандартного образца исследуемой субстанции устанавливали такие характеристики, как специфичность, линейность, аналитическая область, прецизионность и правильность. Для подтверждения специфичности методики готовили растворы субстанции и раствор-плацебо (растворы без содержания исследуемого соединения). Линейность определяли на 5 уровнях различных навесок. Прецизионность устанавливали на 6 параллельных навесках стандартного образца, а правильность методики – на 3 уровнях концентрации в 3 повторностях.

Результаты и обсуждение

Количественное содержание действующего вещества в субстанции определяли титриметрическим методом путем поиска оптимальных условий титрования. Установили, что VMA-10-18 полностью растворяется только в муравьиной кислоте. Поэтому в качестве растворителей использовали смеси муравьиной кислоты с указанными растворителями в соотношении (5:30), что способствовало оптимизации условий количественного определения исследуемой субстанции. Как оказалось, наилучшие результаты титрования были получены при использовании таких

растворителей, как смесь муравьиной кислоты и уксусного ангидрида.

Методика является специфичной, так как в контрольном опыте переход окраски индикатора происходит от прибавления одной капли титранта. Аналитическая область методики для количественного определения действующего вещества в субстанции находится в интервале от 80 до 120% от номинального содержания [8].

Для оценки валидности разработанной методики количественного определения субстанции VMA-10-18 по показателю «Линейность» 5 навесок (точная навеска) растворяли в смеси растворителей муравьиной кислоты и уксусного ангидрида (5:30) и титровали 0,1 М хлорной кислотой, индикатор – 0,5 мл 0,1% раствора кристаллического фиолетового. Полученные данные обрабатывали методом наименьших квадратов с использованием уравнения линейной регрессии $y = bx + a$. Коэффициент корреляции составил 0,9975, что подтверждает валидность данной методики по показателю «Линейность» ($r \geq 0,99$). Аналитическая область методики находится в пределах от 0,15 до 0,25 г.

Для определения прецизионности на уровне повторяемости взвешивали 6 параллельных навесок СО и анализировали по вышеописанной методике (табл. 1). Относительное стандартное отклонение определения изучаемой субстанции находится в пределах $\pm 1,1\%$, что свидетельствует о валидности методики по показателю «Прецизионность» (повторяемость) [8].

Правильность методики показывает близость экспериментальных данных к истинно-

Таблица 1

Данные по прецизионности методики количественного определения субстанции VMA-10-18

Table 1

Data on the precision of assay of the substance VMA-10-18

Взято, г	Найдено, г	$(X_i - \bar{X})$	$(X_i - \bar{X})^2$	Метрологические характеристики
0,2000	0,2003	-0,0004	0,00000016	$X_{cp} = 0,2007$ $SD = 0,0022$ $RSD = 1,1\%$
0,2004	0,2002	-0,0005	0,00000025	
0,2002	0,1999	-0,0008	0,00000064	
0,2000	0,2032	0,0025	0,00000625	
0,2004	0,1974	-0,0033	0,00001089	
0,2002	0,2032	0,0025	0,00000625	
	$X_{cp} = 0,2007$		$\Sigma = 0,00002444$	

му значению во всем диапазоне измерений. Для проверки валидности методики количественного определения субстанции методом кислотно-основного титрования по показателю «Пра-

вильность» готовили 9 образцов на 3 уровнях концентрации. Анализ выполняли по вышеописанной методике. Результаты исследования (табл. 2) свидетельствуют о том, что по показателю «Правильность» на всех 3 уровнях концентрации получены сопоставимые результаты. Открываемость – 99,7% подтверждает пригодность методики по показателю «Правильность».

Таблица 2

Результаты установления правильности методики количественного определения субстанции VMA-10-18

Table 2

Data on the accuracy of assay of the substance VMA-10-18

Уровень	Взято, г	Найдено, г	R, %	Метрологические характеристики
1	0,1489	0,1481	99,5	$\bar{R}=99,7$ $SD=1,12$ $RSD=1,13$
1	0,1496	0,1494	99,9	
1	0,1503	0,1510	100,5	
2	0,2000	0,2032	101,6	
2	0,2004	0,1974	98,5	
2	0,2002	0,2032	101,0	
3	0,2470	0,2445	99,0	
3	0,2535	0,2470	98,4	
3	0,2495	0,2470	99,0	

Согласно полученным данным, разработанная методика количественного определения субстанции VMA-10-18 позволяет получить достоверные результаты, а значит она применима для определения количественного содержания биологически активной субстанции, производной хиназолина.

Разработанная методика была апробирована на серийном образце субстанции. Приготовление анализируемого раствора субстанции, а также его количественное определение осуществляли по вышеописанной методике.

Таблица 3

Статистический анализ данных количественного определения субстанции VMA-10-18

Table 3

Statistical analysis of data on the assay of the substance VMA-10-18

Навеска, г	Найдено, г	X _i , %	(X _i - \bar{X})	(X _i - \bar{X}) ²
0,1993	0,1986	99,6	1,05	1,1025
0,2015	0,2037	101,1	-0,45	0,2025
0,1990	0,2027	101,8	-1,15	1,3225
0,2010	0,1983	98,6	2,05	4,2025
0,1989	0,1999	100,5	0,15	0,0225
0,2059	0,2012	102,3	-1,65	2,7225
				9,5750
Метрологические характеристики				
Среднее значение (\bar{X})			100,6	
Дисперсия (S ²)			1,91	
Стандартное отклонение (S)			1,38	
Доверительный интервал (Δx)			1,451	
Относительная погрешность (ϵ , %)			1,44	
Критерий Стьюдента (t)			1,15	

Согласно полученным результатам статистической обработки (табл. 3), данная методика позволяет достоверно определять количественное содержание субстанции в серийном образце с относительной погрешностью $\pm 1,45$ %.

Для определения систематической погрешности, исходя из результатов количественного определения действующего вещества в серийном образце, был рассчитан коэффициент Стьюдента, величина которого равна 1,15, что позволяет считать полученные результаты свободными от систематической погрешности.

Заключение

Разработана и валидирована методика количественного определения действующего вещества в стандартном образце новой субстанции, производной хиназолин-4(3H)-она. Апробация разработанной методики на примере серийного образца изучаемой суб-

станции позволяет рекомендовать ее для включения в нормативную документацию по контролю качества субстанции VMA-10-18.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Литература

1. Петров В.И., Тюренков И.Н., Озеров А.А. Производные хинолизидина, обладающие антидепрессивной, анксиолитической и ноотропной активностью. Патент РФ № 2507199. Бюллетень № 5, 2014: 12.
2. Цибизова А.А., Самотруева М.А., Ковалев В.Б., Тюренков И.Н. Фармакологическая активность производных бензодиазина. Астраханский медицинский журнал, 2017; 4: 27–43.
3. Михайлов В.А., Дружинин А.К., Шова Н.И. Аффективные постинсультные расстройства: патогенез, диагностика, лечение. Обзорение психиатрии и медицинской психологии, 2018; 1: 115–9.
4. Тюренков И.Н., Озеров А.А., Шматова Е.Н., Арчакова Ю.В. Ноотропная активность амидов хиназолинового ряда. Химико-фармацевтический журнал, 2015; 49 (2): 18–20.
5. Alajbegovic A., Djelilovic-Vranic J., Alajbegovic S. Post-Stroke Depression. Med.Arch., 2014; vol. 68: 47–50.
6. Берлянд А.С., Ковалева Е.Л., Шаназаров К.С. Пути совершенствования и новые подходы к стандартизации фармацевтических субстанций. Фармацевтический анализ. Серия «Проблемы аналитической химии. Отделение химии и наук о материалах РАН». Под ред. Г.К. Будникова, С.Ю. Гармонова. М.: 2013; 23–66.
7. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М., 2015. [Электронное издание]. Режим доступа: <http://femb.ru/feml>

8. Guidelines for standard method performance requirements. Access mode: http://aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/eoma_appendix_f.pdf.

References

1. Petrov V.I., Tyurenkov I.N., Ozerov A.A. Quinolizidine derivatives with antidepressant, anxiolytic and nootropic activity. Patent RF № 2507199. Byulleten' № 5, 2014: 12 (in Russian).
2. Tsibizova A.A., Samotrueva M.A., Kovalev V.B., Tyurenkov I.N. Pharmacological activity of benzodiazine derivatives. Astrakhanskiy meditsinskiy zhurnal, 2017; 4: 27–43 (in Russian).
3. Mikhailov V.A., Druzhinin A.K., Shova N. I. Affective post-stroke disorders: pathogenesis, diagnosis, treatment. Obzreniye psikiatrii i meditsinskoy psikhologii, 2018; 1: 115–9 (in Russian).
4. Tyurenkov I.N., Ozerov A.A., Shmatova E.N., Archakova Yu.V. Nootropic activity of quinazoline amides. Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal, 2015; 49 (2): 18–20 (in Russian).
5. Alajbegovic A., Djelilovic-Vranic J., Alajbegovic S. Post-Stroke Depression. Med.Arch., 2014; vol. 68: 47–50.
6. Berlyand A.S., Kovaleva E.L., Shanazarov K.S. Ways of perfection and new approaches to standardization of pharmaceutical substances. Pharmaceutical analysis. Series «Problems of analytical chemistry. Department of Chemistry and Materials Science RAS» (by ed. Budnikov G.K., Harmonov S.Yu.). Moscow, 2013; 23–66 (in Russian).
7. The State Pharmacopoeia of The Russian Federation, XIV-ed. [Electronic resource]. Access mode: <http://femb.ru/feml> (in Russian).
8. Guidelines for standard method performance requirements. Access mode: http://aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/eoma_appendix_f.pdf.

Поступила 14 декабря 2018 г.

Received 14 december 2019

Принята к публикации 3 апреля 2019 г.

Accepted 3 April 2019