

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА СУБСТАНЦИИ НОВОГО БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО СОЕДИНЕНИЯ 3-[2-(4-ФЕНИЛ-1-ПИПЕРАЗИНО)-2-ОКСОЭТИЛ]-ХИНАЗОЛИН- 4(3Н)-ОНА

Т.А. Гендугов

аспирант,
кафедра неорганической, физической и коллоидной химии,
Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России

Л.И. Щербакова

к.фарм.н., доцент,
зав. кафедрой неорганической, физической и коллоидной химии,
Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России

А.А. Озеров

д.х.н., профессор,
зав. кафедрой фармацевтической и токсикологической химии, Волгоградский государственный медицинский университет

А.А. Глушко

к.фарм.н., ст. преподаватель,
кафедра неорганической, физической и коллоидной химии,
Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России

Цель работы – изучение возможности использования спектрофотометрии в УФ-области для количественного определения ранее не изученной субстанции 3-[2-(4-фенил-1-пиперазино)-2-оксоэтил]-хиназолин-4(3Н)-она (VMA-10-21), а также разработка и валидация методики ее количественного определения.

Материал и методы. В эксперименте использовано аналитическое оборудование: спектрофотометр СФ-56, весы аналитические RADWAGAS 220/C/2, мерная посуда 1-го класса точности. Измерена оптическая плотность испытуемых растворов при длине волны 275 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использован 1%-ный раствор хлороводородной кислоты. Проведена валидация представленной методики по показателям: линейность, прецизионность и правильность. Полученные данные обработаны согласно ОФС.1.1.0013.15 ГФ XIV издания. Выполнен расчет удельного показателя поглощения с использованием стандартного образца субстанции VMA-10-21, чистота которой была доказана методом ВЭЖХ.

Результаты. Спектр субстанции VMA-10-21 в ультрафиолетовой области представлен двумя полосами поглощения с максимумами при длинах волн 235 и 275 нм. Обосновано использование максимума при длине волны 275 нм. Рассчитан удельный показатель поглощения при выбранной длине волны. Разработана методика количественного определения, которая по валидационным параметрам линейность, прецизионность и правильность соответствовала требованиям ОФС.1.1.0012.15 ГФ XIV издания.

Выводы. Изучена возможность использования спектрофотометрии в УФ-области для количественного определения субстанции VMA-10-21. Разработана спектрофотометрическая методика количественного определения основного вещества в субстанции VMA-10-21 и проведена ее валидация.

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

Для цитирования: Гендугов Т.А., Щербакова Л.И., Озеров А.А., Глушко А.А. Разработка и валидация спектрофотометрической методики количественного анализа субстанции нового биологически активного соединения 3-[2-(4-фенил-1-пиперазино)-2-оксоэтил]-хиназолин-4(3Н)-она. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2020; 23(4):50–55. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-04-08>

В настоящее время депрессия – наиболее распространенное психическое расстройство, от нее страдают более 300 млн человек из всех известных возрастных групп: каждый десятый в возрасте старше 40 лет, две трети из них – женщины [1]. Согласно прогнозам Всемирной организации здравоохране-

ния, к 2025–2030 гг. смертность от депрессий выйдет на первое место в мире [2]. Такая тенденция обуславливает актуальность разработки новых биологически активных соединений (БАС) психотропного действия, обладающих высокой терапевтической активностью и меньшим числом побочных эффектов.

Перспективными в плане разработки новых высокоэффективных психотропных лекарственных препаратов являются производные хиназолина, структурно близкие к эндогенным пиримидиновым основаниям и их производным. Данная группа соединений обладает широким спектром фармакологической активности в сочетании с низкой токсичностью [3].

Новое БАС 3-[2-(4-фенил-1-пиперазино)-2-оксоэтил]-хиназолин-4(3H)-он (лабораторный шифр: VMA-10-21) синтезировано в Волгоградском государственном медицинском университете под руководством профессора Александра Александровича Озерова. Предварительные фармакологические исследования показали перспективность его использования в качестве антидепрессивного и анксиолитического лекарственного средства [4].

Спектрофотометрические методы широко применяются в анализе лекарственных препаратов ввиду своей простоты, практичности и дешевизны. Также эти методы рекомендуются для количественного и качественного определения фармацевтических субстанций при их стандартизации. Исследуемое вещество содержит в своей структуре хромофоры, поглощающие электромагнитное излучение в ультрафиолетовой области спектра, что позволяет использовать метод УФ-спектроскопии для разработки методик его анализа [5].

Для исследуемого соединения предварительно была изучена растворимость в различных растворителях [6]. В качестве наименее токсичного и более доступного растворителя был выбран 1%-ный раствор хлороводородной кислоты.

Цель исследования – изучение возможности использования спектрофотометрии в УФ-области для количественного определения субстанции VMA-10-21, разработка и валидация методики анализа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В ходе эксперимента было использовано аналитическое оборудование: спектрофотометр СФ-56, весы аналитические RADWAGAS 220/C/2, мерная посуда 1-го класса точности.

Методика проведения анализа: около 0,0500 г (точная навеска) субстанции помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, объем раствора доводили до метки 1%-ным раствором хлороводородной кислоты, перемешивали. Далее 2 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вме-

стимостью 25 мл и объем раствора доводили до метки тем же растворителем, перемешивали.

Оптическую плотность полученного раствора измеряли при длине волны 275 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали 1%-ный раствор хлороводородной кислоты. Содержание испытуемого вещества в миллиграммах (X) определяли по формуле

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 25}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 2},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; a – навеска субстанции, г; $A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения стандартного образца субстанции при длине волны 275 нм.

В качестве стандартного образца использовали дважды перекристаллизованную субстанцию, не имевшую дополнительных пиков на хроматограмме ВЭЖХ (рис. 1), с содержанием субстанции, равным 100%.

Для построения градуировочного графика 0,0500 г субстанции растворяли в 1%-ной хлороводородной кислоте в мерной колбе вместимостью 100 мл. В мерную колбу вместимостью 100 мл вносили от 1 до 9 мл полученного раствора и доводили тем же растворителем до метки.

Полученные данные обрабатывали методом наименьших квадратов с использованием линейной модели согласно ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов эксперимента»:

$$y = bx + a,$$

где x – количество или концентрация определяемого вещества; y – величина отклика; b – угловой коэффициент линейной зависимости; a – свободный член линейной зависимости [7].

Для расчетов параметров прецизионности проводили шесть параллельных определений по предлагаемой методике: точную навеску (около 0,05 г) определяемого вещества вносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли и доводили до метки 1%-ным раствором хлороводородной кислоты. Затем 4 мл полученного раствора вносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили до метки тем же растворителем. Оптическую плотность измеряли в кюветах с толщиной рабочего слоя 1 см при длине волны 275 нм. В качестве раствора сравнения использовали 1%-ный раствор хлороводородной кислоты. Расчет количественного содержания проводили с использованием величины удельного показателя поглощения.

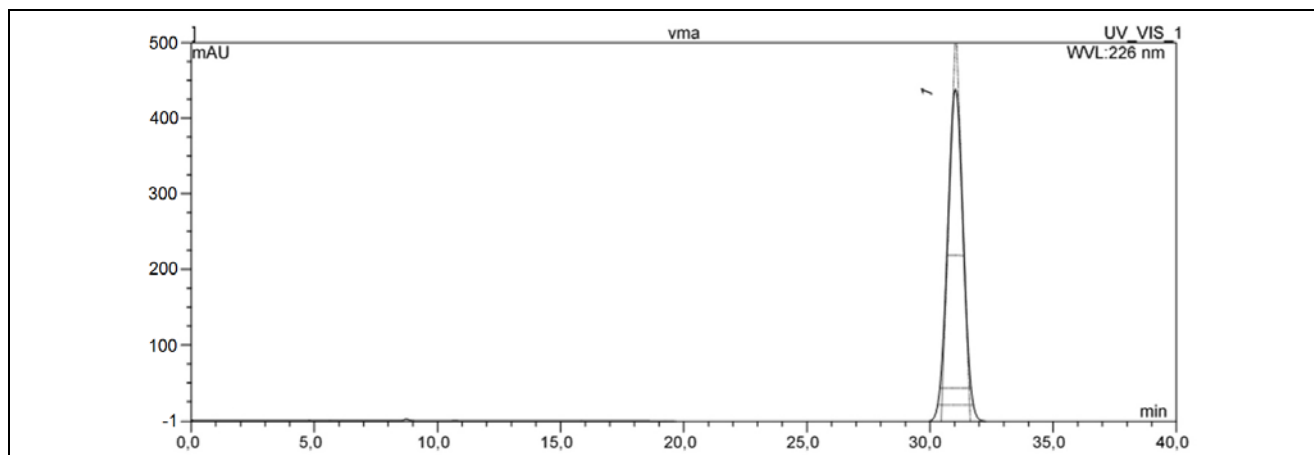


Рис. 1. Хроматограмма стандартного раствора VMA-10-21

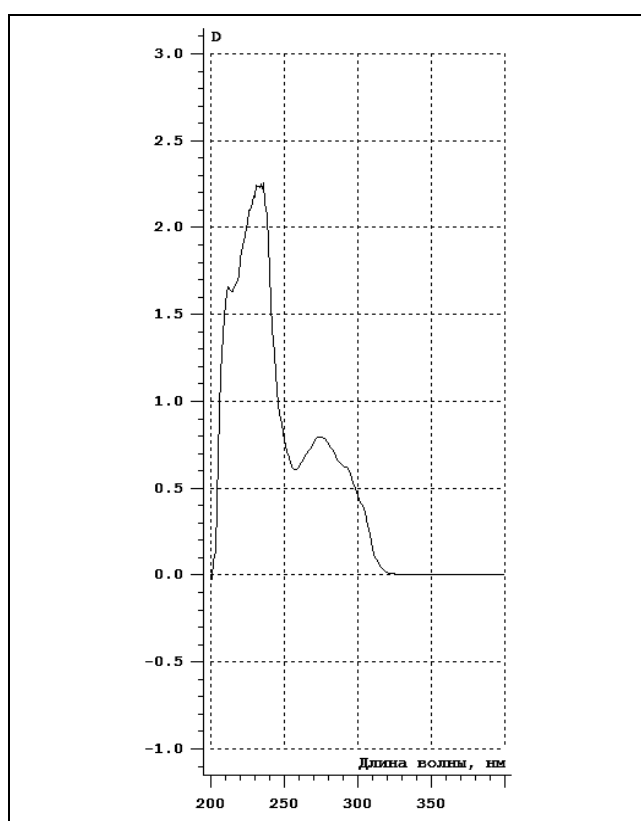


Рис. 2. УФ-спектр поглощения субстанции VMA-10-21

Правильность методики оценивали по критерию открываемости одновременно для девяти растворов. Расчет содержания проводили по удельному показателю поглощения субстанции. Для подтверждения правильности методики использовали модельный раствор, в котором концентрация определяемого вещества соответствовала концентрации на верхнем пределе линейности методики. Из нее готовили разведения на трех уровнях: 1:0,5;

1:1; 1:2 [7]. Также вычисляли величину относительного стандартного отклонения (RSD).

Для установления наличия систематической ошибки в результатах количественного определения вычисляли критерий Стьюдента по уравнению

$$t = \frac{|\mu - \bar{x}| \times \sqrt{m}}{s},$$

где μ – фактическая концентрация субстанции в растворе; \bar{x} – средний результат, полученный в ходе опыта; m – объем выборки; s – стандартное отклонение [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спектр субстанции VMA-10-21 в ультрафиолетовой области, представленный на рис. 2, имеет две полосы поглощения с максимумами при длинах волн 235 и 275 нм.

Наиболее подходящей для количественного определения исследуемой субстанции является полоса поглощения с максимумом при длине волны 275 нм, так как она находится в относительно селективной области спектра и является более пологой по сравнению с полосой с максимумом при длине волны 235 нм. Поэтому в качестве аналитической была использована длина волны 275 нм.

В табл. 1. приведены результаты, использованные для построения градуировочного графика (рис. 3), а также оценка методики характеристикам линейности.

Согласно ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик», приведенная методика валидна по показателю линейность, так как рассчитанный коэффициент корреляции r отвечает условию $|r| \geq 0,99$ [8].

Таблица 1. Оценка аналитической методики характеристикам линейности

Концентрация, г/мл·10 ⁻⁵	Оптическая плотность	Параметры линейной зависимости $y = bx + a$
1	0,195	$b = 0,2016$ $a = -0,0085$ $y = 0,2016x - 0,0085$ $R = 0,9994$
1,5	0,299	
2	0,394	
2,5	0,480	
3	0,602	
3,5	0,693	
4	0,810	
4,5	0,894	

Расчет удельного показателя поглощения ($A_{1\text{см}}^{1\%}$) для растворов стандартного образца представлен в табл. 2.

Результаты определения прецизионности методики приведены в табл. 3.

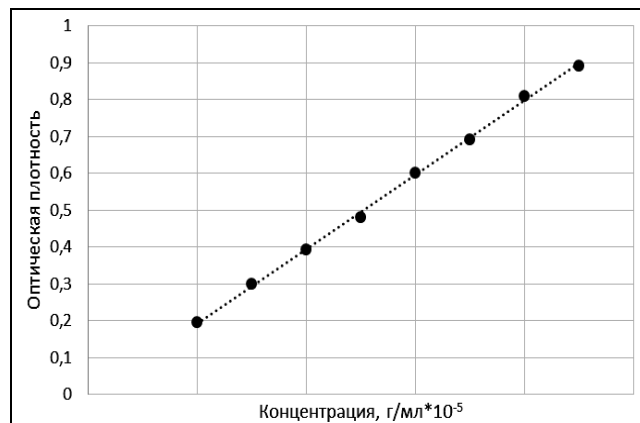


Рис. 3. Градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации определяемого вещества в растворе

Таблица 2. Результаты определения удельного показателя поглощения

Концентрация, г/мл*10 ⁻⁵	Оптическая плотность, A	Удельный показатель поглощения при 275 нм ($A_{1\text{см}}^{1\%}$)	Метрологическая характеристика результатов определения
1	0,195	195,0	$\bar{A}_{1\text{см}}^{1\%} = 197,90$ $S = 3,2872$ $S_{\bar{x}} = 1,1622$ $\Delta\bar{x} = 2,7544$ $\bar{\varepsilon} = 1,39\%$
1,5	0,299	199,3	
2	0,394	197,0	
2,5	0,480	192	
3	0,602	200,7	
3,5	0,693	198,0	
4	0,810	202,5	
4,5	0,894	198,7	

Таблица 3. Результаты определения прецизионности методики количественного определения субстанции VMA-10-21 в растворе

Взято, мг	Оптическая плотность (A)	Найдено, мг	Найдено, % (X)	Метрологические характеристики
50,7	0,3990	50,40	99,42	$\bar{X} = 99,41$ $SD = 0,6203$ $RSD = \pm 0,6239\%$
50,5	0,3965	50,09	99,19	
50,3	0,3981	50,29	99,98	
50,0	0,3970	50,15	100,30	
49,9	0,3900	49,27	98,73	
50,2	0,3929	49,63	98,87	

Относительное стандартное отклонение (RSD) количественного определения субстанции составляет $\pm 0,6239\%$ и находится в рекомендуемых пределах (величина RSD не должна превышать 1%) прецизионности американской ассоциа-

цией аналитической химии (АОАС) [7, 8]. Полученные результаты позволяют утверждать валидность методики по показателю прецизионности.

Результаты определения правильности методики представлены в табл. 4.

Таблица 4. Определение параметров правильности методики

Уровень	Взято, г/мл·10 ⁻⁵	Найдено, г/мл·10 ⁻⁵	Открываемость (R), %	Метрологические характеристики
1 (1:0,5)	3	3,011	100,37	$\bar{X} = 99,75\%$ $SD = 0,7105$ $RSD = \pm 0,7123\%$
	3	3,029	100,97	
	3	2,987	99,57	
2 (1:1)	2,25	2,229	99,07	
	2,25	2,233	99,24	
	2,25	2,23	99,11	
3 (1:2)	1,5	1,493	99,53	
	1,5	1,509	100,6	
	1,5	1,489	99,27	

Значение *R* для субстанций должно находиться в пределах 98–102% [7]. Полученные результаты соответствуют данному требованию. Величина *t* составила 1,06. Это значит, что выполняется неравенство $t < t(P, f)$, так как $1,06 < 2,31$, то результаты не отягощены систематической ошибкой. Полученные результаты доказывают валидность методики по показателю правильности.

ВЫВОДЫ

Разработана и проведена валидация спектрофотометрической методики количественного определения основного вещества в субстанции 3-[2-(4-фенил-1-пиперазино)-2-оксоэтил]-хиназолин-4(3H)-она. Представленная методика может быть применена для количественного определения субстанции VMA-10-21.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ильницкий А., Процаев К. Возрастно-ситуационная депрессия. *Врач.* 2018; 29(9): 48-49.

2. Wittchen H., Jacobi F., Rehm J. The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2011; 21(9):655–679.

3. Кодоиди И.П. Молекулярное конструирование и целенаправленный синтез N- замещенных производных 4-оксо-1,4-дигидропиримидина на основе тормозных нейромедиаторов. *Химико-фармацевтический журнал.* 2009; 43(10):32–39.

4. Патент № 2507199 (РФ). Производные хиназолина, обладающие антидепрессивной и анксиолитической активностью. *Опубл.* 20.02.2014.12 с.

5. Власова И.В. Заводская лаборатория. Диагностика материалов. *Спектрофотометрические методы в анализе лекарственных препаратов.* 2011; 1:21

6. Гендугов Т.А. *Евразийский союз ученых.* 2019; 11-2 (68):46–47.

7. Государственная Фармакопея Российской Федерации. Изд. XIV. Т. 1. М. 2016. [Электронный ресурс].– Режим доступа: <http://feml.scsml.rssi.ru/feml>

8. Гаврилин М.В., Сенченко С.П. Валидация аналитических методик (методические указания для аспирантов и студентов). ГОУ ВПО Пятигорская ГФА Росздрава. Пятигорск, 2008. 37 с.

Поступила после доработки 2 марта 2020 г.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR THE QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE SUBSTANCE OF A NEW BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUND 3-[2-OXO-2-(4-PHENYL-1-PIPERAZINYL)ETHYL]-4(3H)- QUINAZOLINONE

© Authors, 2020

T.A. Gendugov

Post-graduate Student, Department of Inorganic, Physical and Colloidal Chemistry,
Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute - a branch of FGBOU VO VolgGMU of the Ministry of Health of Russia

L.I. Shcherbakova

Ph.D. (Pharm.), Associate Professor, Head of Department of Inorganic, Physical and Colloidal Chemistry,
Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute - a branch of FGBOU VO VolgGMU of the Ministry of Health of Russia

A.A. Ozerov

Dr.Sc. (Chem.), Professor, Head of Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Volgograd State Medical University

A.A. Glushko

Ph.D. (Pharm.), Senior Lecturer, Department of Inorganic, Physical and Colloidal Chemistry,
Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute - a branch of FGBOU VO VolgGMU of the Ministry of Health of Russia

The purpose of the work is to study the possibility of using spectrophotometry in the UV region for the quantitative determination of a previously unstudied substance of 3- [2- (4-phenyl-1-piperazino) -2-oxoethyl] -quinazolin-4 (3H) -one (VMA-10 -21), as well as the development and validation of methods for its quantitative determination.

Material and methods. In the course of the experiment, the analytical equipment was used: spectrophotometer SF-56, analytical balance RADWAG AS 220/C/2, measuring dishes of the 1st accuracy class. The optical density of the test solutions was measured at a wavelength of 275 nm in cuvettes with a layer thickness of 10 mm. As a comparison solution used 1% solution of hydrochloric acid. Validation of the presented methodology was carried out according to indicators: linearity, precision and correctness. Processing of the experimental data was carried out according to OFS.1.1.0013.15 GF XIV edition. The specific absorption index was calculated using a standard sample of substance VMA-10-21, the purity of which was proved using the HPLC method.

Results. The spectrum of the substance VMA-10-21 in the ultraviolet region was represented by two absorption bands with maxima at wavelengths of 235 and 275 nm. The use of a wavelength at a wavelength of 275 nm is justified. The specific absorption index at the selected wavelength was calculated. A quantitative determination technique has been developed which, according to validation parameters, linearity, precision and correctness complies with the requirements of OFS.1.1.0012.15 GF of the XIV edition.

Conclusions. The possibility of using spectrophotometry in the UV region for the quantitative determination of the substance VMA-10-21 was studied. A spectrophotometric method for the quantitative determination of the basic substance in the substance VMA-10-21 was developed and validated.

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

For citation: Gendugov T.A., Shcherbakova L.I., Ozerov A.A., Glushko A.A. Development and validation of a spectrophotometric method for the quantitative analysis of the substance of a new biologically active compound 3-[2-oxo-2-(4-phenyl-1-piperazinyl)ethyl]-4(3H)-quinazolinone. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2020;23(4):50-55. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-04-08>.

REFERENCES

1. Il'nickij A., Proshchaev K. Vozrastno-situacionnaya depressiya. Vrach. 2018; 29(9): 48-49.
2. Wittchen H., Jacobi F., Rehm J. The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010 // Eur. Neuropsychopharmacol. 2011; 21(9):655-679.
3. Kodonidi I.P. Molekulyarnoe konstruirovaniye i tselenapravlennoye sintez N-zameshchennykh proizvodnykh 4-okso-1,4-digidropirimidina na osnove tormoznykh neiromediatorov. Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal. 2009; 43(10):32-39.
4. Patent № 2507199 (RF). Proizvodnyue khinazolina, obladayushchie antidepressivnoi i anksioliticheskoi aktivnost'yu. Opubl. 20.02.2014. 12 s.
5. Vlasov I.V. Zavodskaya laboratoriya. Diagnostika materialov. Spektrofotometricheskie metody v analize lekarstvennykh preparatov. 2011; 1:21.
6. Gendugov T.A. Evraziiskii soyuz uchenykh. 2019; 11-2 (68):46-47.
7. Gosudarstvennaya Farmakopeya Rossiiskoi Federatsii. Izd. XIV. T. 1. M. 2016. [Elektronnyi resurs]. Rezhim dostupa: <http://feml.scsml.rssi.ru/feml>
8. Gavrilin M.V., Senchenko S.P. Validatsiya analiticheskikh metodik (metodicheskie ukaazaniya dlya aspirantov i studentov). GOU VPO Pyatigorskaya GFA Roszdruva. Pyatigorsk. 2008. 37 s.