

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО СОЕДИНЕНИЯ N-[2-[4-ОКСО-3(4Н)-ХИНАЗОЛИНИЛ]ПРОПИОНИЛ]-ГУАНИДИНА МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Е.В. Компанцева

д.фарм.н., профессор,
кафедра фармацевтической химии,
Пятигорский медико-фармацевтический институт - филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (г. Пятигорск)

Д.Н. Луценко

аспирант,
кафедра фармацевтической химии,
Пятигорский медико-фармацевтический институт - филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (г. Пятигорск)
E-mail: lucenkodasha95@mail.ru

Е.Р. Гарсия

аспирант,
кафедра фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов,
Пятигорский медико-фармацевтический институт - филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (г. Пятигорск)

Актуальность. В настоящее время метод капиллярного электрофореза является одним из перспективных и высокоэффективных методов разделения и анализа лекарственных средств, что очень актуально в фармацевтическом производстве. Метод впервые включен в Государственную фармакопею России 13 издания.

Цель исследования. Разработка и валидация методики определения биологически активного соединения (БАС) N-[2-[4-оксо-3(4Н)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина (VMA-13-15) с использованием капиллярного электрофореза.

Объект исследования. Для анализа в качестве объекта было использовано соединение VMA-13-15, полученное в лабораторных условиях. В качестве стандартного образца использовали дважды перекристаллизованное из метанола и высушенное до постоянной массы БАС N-[2-[4-оксо-3(4Н)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина.

Результаты. Разработана методика качественного и количественного определения БАС N-[2-[4-оксо-3(4Н)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом капиллярного электрофореза. Предложенная методика валидна по параметрам: специфичность, линейность, правильность и прецизионность. Показана пригодность хроматографической системы.

Выводы. Методика количественного определения нового кардиопротективного средства может быть рекомендована для включения в проект нормативной документации для количественного определения N-[2-[4-оксо-3(4Н)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина, с целью создания лекарственных препаратов на его основе, как для перорального, так и парентерального введения, а также может служить основанием для определения сроков годности БАС в субстанции, так и в лекарственных препаратах.

Ключевые слова: БАС, капиллярный электрофорез, валидация.

Для цитирования: Компанцева Е.В., Луценко Д.Н., Гарсия Е.Р. Определение биологически активного соединения N-[2-[4-оксо-3(4Н)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом капиллярного электрофореза. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2020;23(10):40–45. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-10-06>

N-[2-[4-оксо-3(4Н)-хиназолинил]пропионил]-гуанидин (VMA-13-15) – новое биологически активное соединение (БАС), обладающее нейпротекторной и кардиопротекторной активностью [1].

Данное соединение представляет научный интерес, так как создание новых цитопротекторных средств является одной из важных задач современной фармакологии в борьбе с заболеваниями сердечно-сосудистой системы.

Ранее было проведено исследование свойств БАС (рис. 1) методом УФ-спектрофотометрии, что позволило разработать методику количественного

определения N-[2-[4-оксо-3(4Н)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина [2]. Однако эта методика не позволяет получить достоверные результаты при определении данного БАС в случае создания

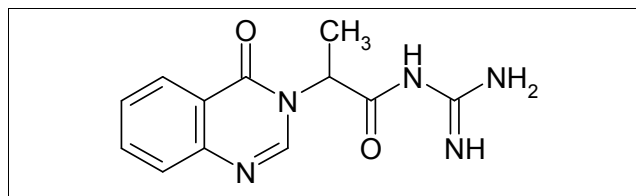


Рис 1. Структурная формула N-[2-[4-оксо-3(4Н)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

вых лекарственных препаратов в присутствии светопоглощающих вспомогательных веществ, при изучении его стабильности, а также в присутствии возможных родственных соединений.

В настоящее время метод капиллярного электрофореза является одним из перспективных и высокоэффективных методов разделения и анализа лекарственных средств, что очень актуально в фармацевтическом производстве. Метод впервые включен в Государственную фармакопею России 13 издания [3].

Ц е л ь и с с л е д о в а н и я – разработка и валидация методики определения БАС N-[2-[4-оксо-3(4Н)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом капиллярного электрофореза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проводили, используя систему капиллярного электрофореза «Капель-105м» (ОАО «Льюмэкс-маркетинг», Россия) с кварцевым капилляром $\frac{L_{эфф}}{L_{общ}} = 50/60$ см, ID = 75 мкм. Детектирование проводили с помощью УФ-детектора при длине волны 268 нм. Взятие навесок осуществляли с помощью весов аналитических ЛВ 210-А (ООО «Сартогосм», Россия). Определение pH буферного раствора проводили при помощи pH-метра Hanna Edge 2002-02 («HANNA Instruments Inc.», Венгрия).

В качестве электролита использовали 0,01 М боратный буферный раствор с pH 9,2±0,02, приготовленный согласно ГОСТ 4919.2-2016 «Реактивы и особо чистые вещества». Методы приготовления буферных растворов». Для анализа в качестве объекта было использовано соединение VMA-13-15, полученное в лабораторных условиях. В качестве стандартного образца (СО) использовали дважды перекристаллизованное из метанола и высушенное до постоянной массы БАС N-[2-[4-оксо-3(4Н)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина.

Методика пробоподготовки. Для предварительных исследований точную навеску (0,0155 г) образца БАС отвешивали и растворяли в 50 мл воды деонизированной в мерной колбе вместимостью 250 мл и доводили этим же растворителем до метки. При помощи микропипетки отбирали последовательно от 300 до 700 мкл полученного раствора, переносили в пробирки типа Эппендорф, прибавляли до 1000 мкл того же растворителя, перемешивали и центрифугировали при 12000 мин⁻¹ 5 мин. Надосадочные растворы с концентрациями

0,01860; 0,02480; 0,03100; 0,03720 и 0,0434 мг/мл соответственно декантировали и подвергали анализу. Раствор СО готовили аналогично.

Предлагаемая методика. Около 0,05 г (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 25 мл воды деонизированной и доводят этим же растворителем до метки (раствор А). Затем 2,5 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл доводят водой деонизированной до метки. Далее при помощи микропипетки отбирают 500 мкл полученного раствора, переносят в пробирку типа Эппендорф, прибавляют 500 мкл того же растворителя и далее поступают как описано в методике пробоподготовки. Содержание БАС в процентах (X) рассчитывают по формуле

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot (100 - W)}$$

где S и S₀ – площади пика испытуемого БАС и его СО на электрофореграмме (ЭФГ) испытуемого раствора и раствора СО соответственно; a – навеска испытуемого БАС, г; W – потеря в массе при высушивании БАС, %; a₀ – навеска СО испытуемого БАС, г; P – содержание испытуемого БАС в СО, %.

Выбор исходных буферного раствора и параметров прибора осуществляли исходя из физико-химических свойств субстанции и анализа литературных источников. Были использованы условия разделения, описанные Ю.А. Полковниковой с соавт., при определении фенибута в микрокапсулах. [4] Одним из наиболее часто используемых в капиллярном электрофорезе щелочных электролитов является боратный буферный раствор, он прост в приготовлении и обладает широким диапазоном pH (7,6–11,0) [5]. Условия анализа БАС (VMA-13-15) методом капиллярного электрофореза следующие:

Буфер	боратный (pH 9,2)
Температура	20 °C
Напряжение.....	20кВ
Время анализа	10 мин
Длина волны.....	268 нм
Капилляр	кварцевый
Длина.....	60 см
Эффективная длина	50 см
Диаметр	75 мкм
Ввод пробы.....	гидродинамически, 30 мбар

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбранные условия определения БАС оказались пригодными для анализа N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина, так как на электрофореграмме стандартного образца с концентрацией раствора 0,0310 мг/мл (рис. 2) четко

виден симметричный пик с оптимальным временем миграции в пределах 7 мин. Электрофореграмма образца БАС выглядит аналогично.

Полученные характеристики испытуемого и стандартного образцов различаются не более чем на 5% (табл. 1).

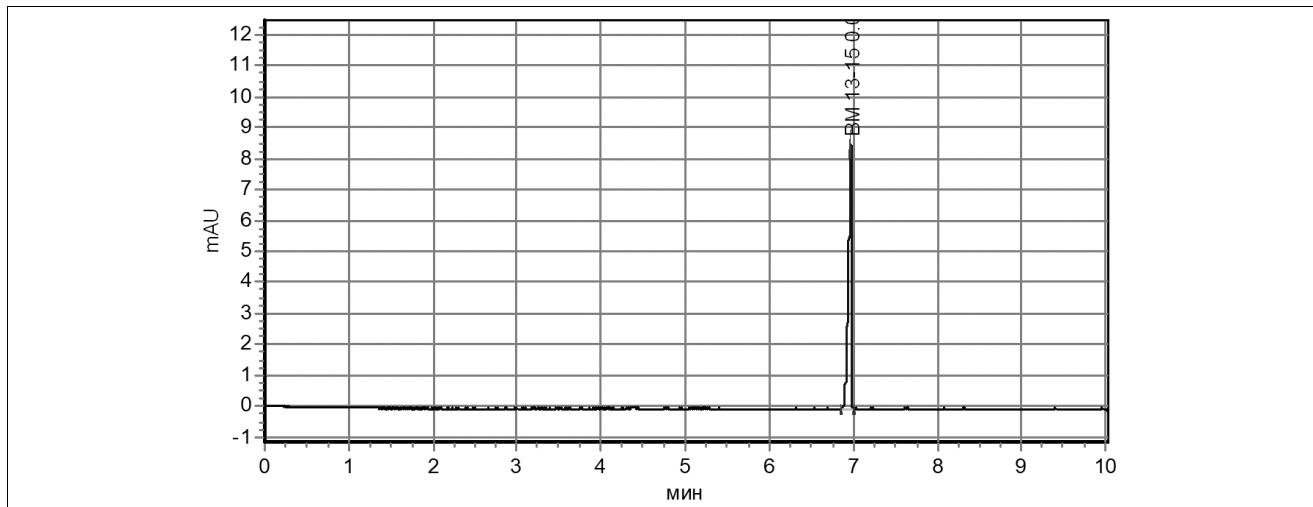


Рис 2. Электрофореграмма стандартного образца N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

Таблица 1. Результаты анализа БАС и стандартного образца VMA-13-15

Показатель	Испытуемый образец	Стандартный образец	Отклонение %
Время, мин	6,985	6,723	3,8
Высота, mAU	8,535	8,927	4,3
Начало, мин	6,862	6,600	3,9
Конец, мин	7,023	6,755	3,9
Площадь	223,8	228,9	2,2
ШПВ	0,040	0,039	2,5
ТТ	168636	170422	0,9
As(0.1)	0,0	0,2	0

Примечание: ШПВ – ширина пика на половине высоты; ТТ – число теоретических тарелок; As-фактор асимметрии.

Таблица 2. Результаты определения пригодности хроматографической системы

№ опыта	Время миграции, мин	Эффективность разделения (число теоретических тарелок)	Площадь пика
1	7,000	169663	226,9
2	6,985	168936	223,8
3	6,773	170422	228,5
4	6,970	183156	222,8
5	6,723	170422	229,2
\bar{X}	6,89	172520	226,2
DS	0,11	5346	2,53
RDS	1,59	3,0	1,11

Представленные в табл. 1 данные могут послужить основанием для возможности идентификации исследуемого вещества, а также для оценки пригодности выбранной хроматографической системы. С этой целью в соответствии с требованиями ОФС.1.2.1.0022.15 «Капиллярный электрофорез» были статистически обработаны и получены значения относительного стандартного отклонения при пяти параллельных определениях

- Эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику..... не менее 150 000 теоретических тарелок
- Относительное стандартное отклонение времени миграции не превышает 5%
- Относительное стандартное отклонение площади пика не превышает 5%

Таким образом, разработанную методику можно рекомендовать для идентификации БАС, полагая, что время миграции пиков на электрофореграммах раствора испытуемого образца и раствора СО, должно совпадать с отклонением, не превышающим 5%.

Валидация методики. Важным критерием оценки методики количественного определения служит доказательство ее пригодности, включающей следующие валидационные характеристики: специфичность, линейность, прецизионность и правильность.

Специфичность. Из результатов, представленных в табл. 1 следует, что значения основных параметров полученных пиков, такие как время миграции, ШПВ, значения теоретических тарелок и фактор асимметрии почти идентичны (полученные значения отличаются друг от друга не более чем на 5%), что свидетельствует о специфичности методики.

Линейность. Для оценки линейности изучали зависимость значений площадей пиков от концентрации пробы, полученных по методике пробоподготовки. Градуировочный график представлен на рис. 3.

Полученные значения площади пиков находятся в линейной зависимости от концентрации взятой пробы. Коэффициент корреляции $r=0,9993$ соответствует требованиям ОФС.1.1.0012.15 ($r=0,997$) [6]. Таким образом, методика по критерию линейность валидна и может быть рекомендована для количественного определения N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина в аналитической области концентраций от 0,01 до 0,06 мг/мл.

СО ($a=0,0155$ г) испытуемого соединения для времени миграции, кажущегося числа теоретических тарелок и площади пика (табл. 2). Относительная ошибка определения времени миграции, площади пика и эффективности не превышает 3%.

На основании полученных данных хроматографическая система будет считаться пригодной, если выполняются следующие условия:

Прецизионность. В соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012.15, на этапе разработки оригинальной методики достаточно определять повторяемость (сходимость) результатов, получаемых с ее применением [8]. Для анализа использовали предлагаемую методику и испытуемый образец с потерей массы при высушивании 0,5% (табл. 3).

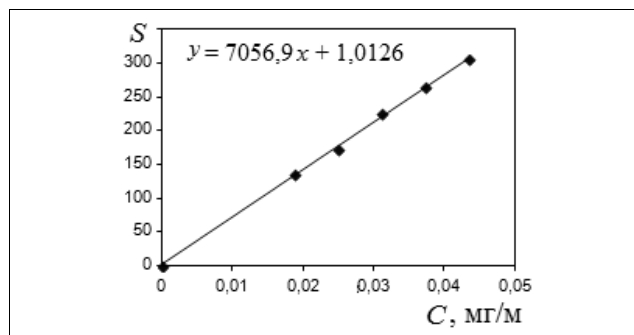


Рис 3. Градуировочный график линейной зависимости площади пиков от концентрации БАС

Таблица 3. Результаты повторяемости (сходимости) определения N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом капиллярного электрофореза ($a_0=0,0500$ г; $S_0=179,8$)

Навеска, г	S	Найдено, %	Метрологические характеристики
0,0502	177,1	98,48	$X_{cp}=99,63$ $SD=1,31$ $RSD=1,31$ $S_x=0,53$ $e=1,39$
0,0501	182,2	99,86	
0,0498	187,4	100,75	
0,0500	177,8	99,02	
0,0499	181,6	101,51	
0,0497	175,6	98,16	

Установлено, что относительное стандартное отклонение составляет 1,31%, что свидетельствует о достаточно высокой сходимости результатов количественного определения. Относительная погрешность определения не превышает значения 1,39%.

Правильность. При тестировании методики по критерию правильность применяли значение свободного члена, полученного из уравнения регрессии. Известно, если свободный член в уравнении статистически достоверно не отличается от нуля, то при использовании такой методики результаты не имеют систематической ошибки. Из полученных результатов, статистической обработки уравнения коэффициент «b» имеет доверительный интервал 315,36 (7056,9x ± 315,36), а свободный член «a» значимо не отличается от нуля, потому что его доверительный интервал равен 8,11 (1,01±8,11) и значительно превышает значение коэффициента. Из-за того, что свободный член «a» = 0, уравнение принимает вид $y = 7056,9x$, и предлагаемая методика не отягощена систематической погрешностью [7].

ВЫВОДЫ

1. Разработана методика качественного и количественного определения БАС N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом капиллярного электрофореза. Предложенная методика валидна по показателям: специфичность, линейность, правильность и прецизионность. Показана пригодность хроматографической системы.
2. Методика количественного определения нового кардиопротективного средства может быть рекомендована для включения в проект нормативной документации для количественного

определения N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина, для создаваемых лекарственных препаратов на его основе, как для перорального, так и парентерального введения, а также может служить основанием для определения сроков годности БАС как в субстанции, так и в его лекарственных препаратах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Патент № 2622638 (РФ). Производные хиназолин-4(3H)-она, обладающие нейро- и кардиопротекторной активностью. В.И. Петров, И.Н. Тюренков, А.А. Озеров, М.С. Новиков и др. 2016129010; заявл., 14.07.2016; опубл. 19.06.17. Бюл. № 17.
2. *Компанцева Е.В., Луценко Д.Н.* Спектрофотометрическое определение нового биологически активного соединения кардиопротекторного действия. Беликовские чтения. Материалы VII Всеросс. науч.-практич. конф. 2019; 246–252.
3. Государственная Фармакопея Российской Федерации. Изд. XIII. Т. 1. М., 2015.
4. *Полковникова Ю.А., Корянова К.Н., Сливкин А.И. и др.* Разработка и валидация методики количественного определения фенибута в микрокапсулах. Химико-фармацевтический журнал. 2018; 56–60.
5. *Тишков Т.М., Погребняк А.В., Озеров А.А.* Разработка методики количественного определения соединения VMU-2012-05 (1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила) в таблетках. Кубанский научный медицинский вестник. 2018; 123–128.
6. *Сенченко С.П., Компанцева Е.В.* Изучение электрофоретического поведения флавоноидов с целью разработки методологических подходов к их анализу в условиях капиллярного зонного электрофореза [Электронный ресурс]. Современные проблемы науки и образования. 2015; 4. Режим доступа: www.science-education.ru/127-20806.
7. Государственная Фармакопея Российской Федерации. Изд. XIV. М.: МЗ РФ. 2018; 1: 276–288 [Электронный ресурс].
8. *Дерффель К.* Статистика в аналитической химии. М.: Мир, 1994. 268 с.

Поступила после доработки 8 июля 2020 г.

DETERMINATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS N-[2-[4-OXO-3(4H)-QINAZOLINYL] PROPIONYL]-GUANIDINE BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

© Authors, 2020

E.V. Kompantseva

Dr.Sc. (Pharm.), Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute-Branch of Volgograd State Medical University (Pyatigorsk)

D.N. Lutsenko

Post-graduate Student, Department of Pharmaceutical Chemistry, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute-Branch of Volgograd State Medical University (Pyatigorsk)
E-mail: lucenkodasha95@mail.ru

E.R. Garcia

Post-graduate Student, кафедра фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов,
Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute-Branch of Volgograd State Medical University (Pyatigorsk)

Currently, the capillary electrophoresis method is one of the most promising and highly effective methods of separation and analysis of medicines, which is very important in pharmaceutical production. The method was first included in the State Pharmacopoeia of Russia in the 13th edition.

The purpose of this study was to develop and validate a method for determining the biologically active compound (BAS) N-[2-[4-oxo-3(4H)-quinazolinyl]propionyl]-guanidine (VMA-13-15) using capillary electrophoresis.

Object of research. For analysis, the VMA-13-15 compound obtained in the laboratory was used as an object. As a standard sample (CO), n-[2-[4-oxo-3(4H)-quinazolinyl]propionyl]-guanidine BAS was recrystallized twice from methanol and dried to a constant mass.

Results. A method for qualitative and quantitative determination of BAS N-[2-[4-oxo-3(4H)-quinazolinyl]propionyl]-guanidine by capillary electrophoresis was developed. The proposed method is valid for the following parameters: specificity, linearity, correctness, and precision. The suitability of the chromatographic system is shown.

Conclusions. The method of quantitative determination of a new cardioprotective agent can be recommended for inclusion in the draft regulatory documentation for the quantitative determination of N-[2-[4-oxo-3(4H)-quinazolinyl]propionyl] – guanidine, for created medicines based on it, both for oral and parenteral administration, and can also serve as a basis for determining the shelf life of ALS both in the substance and in its medicinal products.

Key words: BAS, capillary electrophoresis, validation.

For citation: Kompantseva E.V., Lutsenko D.N., Garcia E.R. Determination of biologically active compounds N-[2-[4-oxo-3(4H)-quinazolinyl]propionyl]-guanidine by capillary electrophoresis. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2020;23(10):40–45. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-10-06>

REFERENCES

1. Patent № 2622638 (RF). Proizvodnye hinazolin-4(3n)-ona, obladajushhie nejro- i kardioprotektojnogo aktivnost'ju. V.I. Petrov, I.N. Tjurenkov, A.A. Ozerov, M.S. Novikov i dr. 2016129010; zajavl., 14.07.2016; opubl.19.06.17. Bjul. № 17.
2. Kompanceva E.V., Lucenko D.N. Spektrofotometricheskoe opredelenie novogo biologicheskij aktivnogo soedinenija kardioprotektojnogo dejstvija. Belikovskie chtenija. Materialy VII Vseross. nauch.-praktich. konf. 2019; 246-252.
3. Gosudarstvennaja Farmakopeja Rossijskoj Federacii. Izd. XIII. T. 1. M., 2015.
4. Polkovnikova Ju.A., Korjanova K.N., Slivkin A.I. i dr. Razrabotka i validacija metodiki kolichestvennogo opredelenija fenibuta v mikro kapsulah. Himiko-farmaceuticheskij zhurnal. 2018; 56-60.
5. Tishkov T.M., Pogrebnyak A.V., Ozerov A.A. Razrabotka metodiki kolichestvennogo opredelenija soedinenija VMU-2012-05 (1-[2-(2-benzoilfenoksi)jetil]-6-metiluracila) v tabletkah. Kubanskij nauchnyj medicinskij vestnik. 2018; 123-128.
6. Senchenko S.P., Kompanceva E.V. Izuchenie jelectroforeticheskogo povedenija flavonoidov s cel'ju razrabotki metodologicheskij podhodov k ih analizu v uslovijah kapilljarnogo zonnogo jelectroforeza [Jelectronnyj resurs]. Sovremennye problemy nauki i obrazovanija. 2015; 4. Rezhim dostupa: www.science-education.ru/127-20806.
7. Gosudarstvennaja Farmakopeja Rossijskoj Federacii. Izd. XIV. M.: MZ RF. 2018; 1: 276-288 [Jelectronnyj resurs].
8. Derffel' K. Statistika v analiticheskoj himii. M.: Mir, 1994. 268 s.



Лекарственные препараты, разработанные ВИЛАР

Хелепин (таблетки, мазь) рег. №№ 87/1186/10; 87/1186/7 – противовирусное средство при заболеваниях, вызываемых ДНК-геномными вирусами группы герпеса, получаемое из травы дикорастущего растения леспециды копеечниковой (*Lespedeza hedysaroides* (Pall.) Kitag.).

Хелепин Д (таблетки, мазь, глазные капли), рег. №№ 94/108/6; 94/108/7; 99/47/11 – противовирусное средство, получаемое из травы культивируемого растения десмодиума канадского (*Desmodium canadense* D.C.).

Тел. контакта: 8(495)388-55-09; 8(495)388-61-09; 8(495)712-10-45
Факс: 8(495)712-09-18;
e-mail: vilarnii.ru; www.vilarnii.ru