

УДК 615.038:615.07:54.061/062

© Бевз Н.Ю., Колісник С.В., Болотов В.В., Бисага Є.І., 2012

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ОРИГІНАЛЬНОЇ СУБСТАНЦІЇ НООКСИН

Бевз Н.Ю., Колісник С.В., Болотов В.В., Бисага Є.І.*

Національний фармацевтичний університет; *Ужгородський національний університет

Дослідження в галузі синтезу 2-оксоіндолін-карбонових кислот та їх похідних є одним з наукових напрямків НФаУ (наукової школи проф. Петюніна П.О., проф. Болотова В.В.). Проте біологічна активність похідних із фрагментом 2-(2-оксоіндолін-3-іліден)оцтової кислоти практично не досліджувалась. З метою пошуку нових біологічно активних сполук у ряду 2-оксоіндоліну, нами синтезований етиловий естер N-[(2-оксоіндоліліден-3)-2-оксіацетил]-амінооцтової кислоти (умовна назва Нооксин), який показав у експерименті високу ноотропну та анксиолітичну активність при низькій токсичності і рекомендований для доклінічних випробовувань [6,7]. Для впровадження лікарського засобу у виробництво необхідно проведення стандартизації діючої речовини в субстанції.

Мета роботи: розробка методик ідентифікації та кількісного визначення етилового естеру N-[(2-оксоіндоліліден-3)-2-оксіацетил]-амінооцтової кислоти (Нооксину) для їх подальшого застосування в методах контролю якості на дану речовину.

Для ідентифікації Нооксину за вимогами Державної фармакопеї України використовували комплекс фізичних (визначення температури плавлення), хімічних та фізико-хімічних (ІЧ-, УФ-спектроскопія) методів аналізу. Досліди проводились згідно вимог Державної фармакопеї України щодо субстанцій [4,5].

Матеріали та методи дослідження. Для проведення досліджень використовували хроматографічно чистий зразок Нооксину (вміст домішок менше 0,5%). В роботі застосовували мірний посуд класу А, реактиви, які відповідають вимогам ДФУ, аналітичні ваги «AXIS», спектрофотометр «SPECORD 200», хроматографічні пластинки з шаром силікагелю GF₂₅₄. ІЧ-спектр субстанції записано на приладі «Tensor 27» у таблетках КВг, концентрація речовини 1%.

Ідентифікація:

А. Інфрачервоний спектр поглинання етилового естеру N-[(2-оксоіндоліліден-3)-2-оксіацетил]-амінооцтової кислоти, одержаний у дисках із калію бромідом *P*, має відповідати спектру стандартного зразка Нооксину.

В. 50 мг речовини розчиняють у 96% спирті *P* і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50,0 см³. 1,0 см³ одержаного розчину доводять 96% спиртом *P* до об'єму 50,0 см³. Абсорбційний спектр одержаного розчину в області від 220 нм до 450 нм повинен мати три максимуми: за довжини хвилі 272 нм, 278 нм та 346 нм. Відношення оптичної густини в максимумі за довжини хвилі 346 нм до оптичної густини в максимумі за довжини хвилі 272 нм має бути від 0,70 до 0,86.

С. Метод тонкошарової хроматографії.

Випробовуваний розчин. 0,050 г речовини розчиняють у 20 см³ спирту етилового *P* і доводять об'єм хлороформом *P* до 50 см³.

Розчин порівняння (а). 0,050 г стандартного зразка Нооксину розчиняють у 20 см³ спирту етилового *P* і доводять об'єм хлороформом *P* до 50 см³. Розчин готують безпосередньо перед використанням.

Розчин порівняння (б). 1 см³ випробовуваного розчину (а) доводять хлороформом *P* до 10 см³.

На лінію старту хроматографічної пластинки із шаром силікагелю GF₂₅₄ наносять 10 мкл (100 мкг) випробовуваного розчину і 5 мкл (0,5 мкг) розчину порівняння. Пластинку поміщають у камеру із сумішшю розчинників діоксан – гексан – кислота мурашина (1:1:0,1). Коли фронт розчинників пройде відстань 10 см від лінії старту, пластинку виймають із камери, висушують на повітрі та проявляють парами йоду.

На хроматограмі випробовуваного розчину будь-яка пляма, окрім основної, не має бути інтенсивнішою за пляму на хроматограмі розчину порівняння (0,5%).

Примітка. Придатність хроматографічної системи.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо:

- R_f основної плями знаходиться близько 0,62;
- на хроматограмі 5 мкл (0,5 мкг) речовини чітко видно пляму.

Д. 0,05 г речовини розчиняють у 10 см³ 0,1 М розчину натрію гідроксиду. Одержаний розчин ділять на дві частини. До однієї додають 0,1 см³ розчину міді сульфату *P*, до другої – 0,1 см³ розчину кобальту нітрату *P*. Поступово у першому випадку утворюється осад трав'янисто-зеленого кольору, у другому – осад блакитно-сірого кольору.

Е. 0,05 г речовини розчиняють у 10 см³ спирту етилового 96% і додають 1-2 краплі розчину заліза (ІІІ) хлориду *P*₂; спостерігається чорно-зелене забарвлення.

Є. 0,05 г речовини розчиняють у 5 см³ розчину натрію гідроксиду розведеного *P*, нагрівають і додають 0,05 М розчин йоду до жовтого забарвлення, що не зникає; відчувається запах йодоформу.

Є. Субстанція дає реакцію на естери складні.

Кількісне визначення.

0,250 г досліджуваної речовини поміщають у колбу із притертою склянкою пробкою, розчиняють у 25 см³ диметилформаміду *P* і додають 0,05 см³ розчину 3 г/дм³ тимолового синього *P* у метанолі *P*. Одержаний розчин титрують 0,1 М розчином натрію метилату до яскраво-зеленого забарвлення.

Паралельно проводять контрольний дослід.

Ведуть титрування до синього забарвлення розчину.

1 см³ 0,1 М розчину натрію метилату відповідає 29,03 мг C₁₄H₁₄N₂O₅, якого повинно бути від 99,0% до 101,0%.

Результати дослідження та їх обговорення.

Ультрафіолетовий спектр поглинання речовини зумовлений наявністю у її молекулі 2-оксоіндолінового циклу, що поєднується із залишком 2-гідроксиліденацетиламінооцтової кислоти. У короткохвильовій ділянці спектру спостерігається комбінована смуга поглинання бензольного типу, що складається з перегину смуги вбирання при 246-250 нм і двох максимумів при 272 нм та 278 нм (рис. 1). Жовте забарвлення речовини зумовлює наявність широкої похилої довгохвильової смуги вбирання з максимумом при 346 нм. Встановлено, що відношення оптичної густини в максимумі при довжині хвилі 346 нм до оптичної густини в максимумі при 272 нм має бути від 0,70 до 0,86.

В ІЧ-спектрі Нооксину в досліджуваному діапазоні частот від 4000 до 400 см⁻¹ спостерігаються характеристичні смуги коливань при 3360 см⁻¹ (ν N–H амід), 3194 см⁻¹ (ν OH), 1754 см⁻¹ (амід I), 1510 см⁻¹ (амід II), 1376 см⁻¹ (δ O–H), 1217 см⁻¹ (ν C–O естеру).

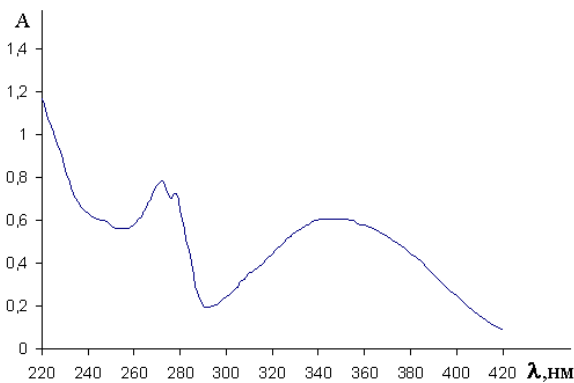


Рис. 1. Абсорбційний спектр 0,002% етанольного розчину Нооксину

З хімічних реакцій ідентифікації використовували реакцію на оксоіндоліновий цикл – при взаємодії зі спиртовим розчином заліза (III) хлориду спостерігалось чорно-зелене забарвлення. Наявність естерного угруповання підтверджували фармакопейною реакцією на складні естери (гідроксимова проба), а також реакцією на етоксигрупу – утворення йодоформу.

Для ідентифікації та перевірки чистоти аналізованої субстанції використовували метод тонкошарової хроматографії на пластинках із шаром силікагелю GF₂₅₄ у системі розчинників діоксан – гексан – кислота мурашина (1:1:0,1). Хроматограми проявляли парами йоду. На хроматограмі досліджуваного розчину спостерігалася основна пляма, яка за розміром, забарвленням, інтенсивністю та розташуванням (R_f близько 0,62) відповідає плямі на хроматограмі розчину порівняння. Жодна додаткова пляма на хроматограмі досліджуваного розчину не перевищувала за розміром та інтенсивністю забарвлення пляму на хроматограмі розчину

порівняння *v* (не більше 0,5%).

Грунтуючись на наявності лактам-лактимної таутомерії 2-оксоіндолінового циклу та енольного гідроксилилу, для кількісного визначення Нооксину застосовували неводне алкаліметричне титрування. Як розчинник був обраний диметилформамід – основний розчинник, який володіє диференціуючою дією та підсилює кислотні властивості сполук. Крім того, етиловий естер N-[(2-оксоіндолін-3-іл)-2-оксацетил]-амінооцтової кислоти добре розчиняється в диметилформаміді. Титрантом обраний фармакопейний 0,1 М розчин натрію метилату. Для вибору індикатора було проведено потенціометричне титрування, визначено стрибок титрування (рН=12,5). Потім дослід повторювали у присутності індикатора тимолового синього. Доведено, що змінення забарвлення індикатора відбувається в межах стрибка титрування та крапельна похибка незначна.

Валідацію методики кислотно-основного індикаторного титрування субстанції Нооксину проводили згідно з вимогами ДФУ [5]. Для проведення валідації методики титрування використовували експериментальну серію субстанції Нооксину, яка відповідала вимогам діючої специфікації. Втрата в масі при висушуванні складає менше 0,01%.

Контроль супутніх домішок проводили методом ТШХ. Жодних додаткових плям виявлено не було (таким чином вміст домішок становить менше 0,50%), тому можна вважати, що вимога до чистоти субстанції, яку використовували для проведення валідації титриметричних методик виконується ($\sum Im_i \leq 0,32 \cdot \max \Delta_{As} = 0,32\%$). Враховуючи це у подальших розрахунках вміст основної речовини приймали рівним 100%.

З метою зменшення невизначеності, встановлення титру 0,1 М розчину натрію метилату проводили за методикою ДФУ [3], використовуючи фармакопейний зразок вихідної стандартної речовини для титрованих розчинів – *кислоти бензойної РО*. Було отримано середнє значення з 5 паралельних титрувань. Значення коефіцієнта поправки до номінальної концентрації титрованого розчину $K_T = 0,9987$ з відносним стандартним відхиленням $RSD = 0,10\%$ та довірчим інтервалом $\Delta(\text{titr}) = 0,10\%$. Таким чином, витримуються вимоги ДФУ до збіжності результатів визначення титру ($\leq 0,2\%$) [5].

Номінальний об'єм титрування розраховували за формулою:

$$V_T = \frac{m_T}{K_T \cdot m_{1mL}} \cdot \left(1 - \frac{LD}{100}\right) = \frac{250}{0,9987 \cdot 29,03} \cdot \left(1 - \frac{0}{100}\right) = 8,62 \text{ см}^3,$$

де m_{1mL} – кількість грамів (міліграмів) субстанції, що титрується, яка відповідає 1 см³ титрованого розчину номінальної концентрації, K_T – коефіцієнт поправки до номінальної концентрації титрованого розчину, LD – втрата в масі при висушуванні у відсотках.

Номінальний об'єм титрування складає 86,2 % від об'єму бюретки місткістю 10 см³, що відповідає вимогам ДФУ – близько 80 % [1,2,8].

Вплив індикатора. Розчин *тимолового синього Р* у метанолі *Р* – це розчин 3 мг/см³ тимолового синього (М.м. 466,6 у.о.) у метанолі [5]. 0,05 см³

цього розчину містять $0,05 \cdot 3 / 466,6 = 0,00032$ мг-моль тимолового синього, на титрування чого буде витрачено $0,00032 / (0,9987 \cdot 0,1) = 0,0032 \text{ см}^3 \cdot 0,99987$ М розчину натрію метилату. Це складає $100 \cdot 0,0032 / 8,62 = 0,04\% \leq 0,32\%$ від номінального об'єму титрування, що є незначущим у порівнянні з максимально допустимою невизначеністю аналізу $\max \Delta_{As} = 1,0\%$.

Об'єм контрольного досліду $V_o = 0,10 \text{ см}^3$ складає $1,16\%$ від номінального об'єму титрування, що можна пояснити присутністю у диметилформаміді продуктів кислотного характеру, які утворюються при поглинанні карбону діоксиду з навколишнього повітря та продуктів гідролізу самого розчинника.

Враховуючи похибку бюретки та взяття нава-

жки, загальна невизначеність пробопідготовки (Δ_{SP}) складає:

$$\Delta_{SP} = \sqrt{0,08^2 + 0,20^2 + 0,04^2 + 0,10^2} = 0,24\%$$

Наважки для визначення лінійності брали для різних точок (i) прямої, які складали 80, 90, 100, 110 і 120% від номінальної маси 250 мг. Для дослідження відтворюваності результатів для різних дослідів з вивчення лінійності, брали по 3 наважки для кожної точки (i) (табл. 1). Відповідно для прямої отримували набір з 15 точок, які окремо обробляли за методом найменших квадратів. У формулах використовували $m_T = 250$ мг і $V_T = 8,62 \text{ см}^3$. Величини X_i , Y_i і Z_i наведені у табл. 1.

Таблиця 1. Правильність та збіжність результатів кількісного визначення Нооксину К = 0,9987

№ модельного розчину	Кількість Нооксину в пробі	Введено у % до концентрації розчину порівняння (X_i факт %)	Об'єм 0,1 М розчину CH_3ONa , V, см^3 (K=0,9987)	Знайдено у % до концентрації розчину порівняння (Y_i %)	Знайдено у % до введеного $Z_i = 100(Y_i/X_i)$	Значення відхилення d_i	квадрат d_i
1	0,2004	80,00%	6,90	80,02	100,02	-0,33	0,11
2	0,2001	80,00%	6,95	80,60	100,75	0,40	0,16
3	0,1998	80,00%	6,90	80,02	100,02	-0,33	0,11
4	0,2251	90,00%	7,75	89,88	99,86	-0,49	0,24
5	0,2249	90,00%	7,80	90,46	100,51	0,16	0,02
6	0,2253	90,00%	7,80	90,46	100,51	0,16	0,02
7	0,2503	100,00%	8,65	100,31	100,31	-0,04	0,00
8	0,2507	100,00%	8,70	100,89	100,89	0,54	0,29
9	0,2501	100,00%	8,65	100,31	100,31	-0,04	0,00
10	0,2749	110,00%	9,50	110,17	100,16	-0,20	0,04
11	0,2751	110,00%	9,55	110,75	100,68	0,33	0,11
12	0,2754	110,00%	9,55	110,75	100,68	0,33	0,11
13	0,3003	120,00%	10,35	120,03	100,02	-0,33	0,11
14	0,3001	120,00%	10,35	120,03	100,02	-0,33	0,11
15	0,2997	120,00%	10,40	120,61	100,51	0,16	0,02
середнє Z%					100,35		0,10
відносне стандартне відхилення, Sz%					0,3222		0,32
відносний довірчий інтервал $\Delta_{as}\% = t(95\%, 14) \cdot Sz$					0,5674		
критичне значення для збіжності результатів $\Delta_{as}\%$					1,28%		
систематична погрішність δ					-0,35		
критерій невизначеності систематичної погрішності $\delta \leq \Delta_{as} / (g) \cdot 0,5 = 0,4096$, то $\delta \leq 0,4096$					0,41		

Результати обробки лінійної залежності 15 точок за прямою методом найменших квадратів наведені в табл. 2. Як видно з табл. 2, вимога одночасної статистичної незначущості величин

$|a|$ та $|1-b|$ виконується для набору з 15 точок, що задовольняє вимогам практичної прийнятності лінійної залежності.

Таблиця 2. Результати визначення лінійної залежності

b	1,0031	100,35	100,0000
Sb	0,0060		
a	0,0387		
Sa	0,6101		
Залишкове стандартне відхилення S_o	0,3309		
r	0,9998		
RSDrange	14,6385		
Ro	0,9997		
Sb ²	0,00004		
Sa ²	0,3723		
$\delta_{RL,80} = 100 \cdot \left \frac{a}{80} + (b-1) \right \leq \frac{2}{3} \cdot \max \Delta_{As} \leq 0,3200$	0,3615		
$\delta_{RL,120} = 100 \cdot \left \frac{a}{120} + (b-1) \right \leq \frac{2}{3} \cdot \max \Delta_{As} \leq 0,3200$	0,3454		
MB	2,01		
MKB	6,08		

Слід зазначити, що максимальна величина систематичної похибки може спостерігатися як при 80% номінального утримання ($\delta_{RL,80}$), так і при 120% ($\delta_{RL,120}$). Це підтверджує необхідність використання співвідношення практичної незначущості систематичної похибки (табл. 2):

$$\delta_{RL,80} = 100 \cdot \left| \frac{a}{80} + (b-1) \right| \leq \frac{2}{3} \cdot \max \Delta_{As}$$

$$\delta_{RL,120} = 100 \cdot \left| \frac{a}{120} + (b-1) \right| \leq \frac{2}{3} \cdot \max \Delta_{As}$$

Межа визначення (МВ) та межа кількісного визначення (МКВ) не перевищують 32%, тобто вони значимо не впливають на проведення кількісного визначення (табл. 2).

З проведених розрахунків видно, що максимально допустиме значення повної прогнозова-

ної невизначеності методики аналізу більше за повну розрахункову невизначеність розробленої методики кількісного визначення Нооксину у субстанції. Отже методика неводного алкаліметричного титрування може бути використана для кількісного визначення з допуском вмісту діючих речовин $\pm 1,0\%$.

Висновки: Розроблені методики ідентифікації нового потенційного лікарського засобу – Нооксину, які дозволяють доволі повно довести будову досліджуваної речовини.

Розроблено методику кількісного визначення Нооксину в субстанції методом кислотно-основного титрування у неводному середовищі. Визначені основні валідаційні характеристики зазначеної методики.

ЛІТЕРАТУРА:

1. **Георгіянец В.А.** Валідація аналітичних методик у фармації: теорія, нормативні аспекти, проблеми практики / В.А. Георгіянец, О.А. Євтіфєєва // Фармац. часопис. – 2007. – № 2. – С. 13-18.
2. **Гриздуб А.И.** Стандартные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств / А.И. Гриздуб // Фармаком. – 2006. – № 1/2. – С. 35-44.
3. Державна фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х.: ООО «PIPEG», 2001. – 556 с.
4. Державна фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків, 2001. – Доповнення 1. – 2004. – 520 с.
5. Державна Фармакопея України / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 1-е вид. – Доповн. 4. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2011. – 540 с.
6. Доклінічне вивчення ноотропної активності та супутніх психотропних властивостей похідних 2-оксоіндоліну / **О.В. Шатілов, С.Ю. Штриголь, С.В. Колісник, В.В. Болотов** // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Укр. мед. стоматол. акад. – 2009. – Т. 9, вип. 2 (26). – С. 139 – 142.
7. Патент на винахід 91166 (2010) Україна, МПК А61К31/404 (2006.01), А61К31/405 (2006.01). – Застосування етилового естеру N-[(2-оксоіндолініліден-3)-2-оксіацетил]-амінооцтової кислоти як ноотропного та анксиолітичного засобу / **Болотов В.В., Колісник С.В., Штриголь С.Ю., Шатілов О.В.** – № а 200908644; заявл. 17.08.09; опубл. 25.06.10, Бюл. №12 – 12 с.
8. Technical Guide for the Elaboration of Monographs. European Pharmacopoeia. European Directorate for the Quality of Medicines. – 2nd ed. – Council of Europe, Strasbourg, 1996. – 73 p.

Бевз Н.Ю., Колісник С.В., Болотов В.В., Бисага Є.І. Розробка та валідація методик контролю якості оригінальної субстанції нооксин // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, № 3. – С. 11-14.

Розроблено методики ідентифікації та кількісного визначення Нооксину – оригінальної субстанції з ноотропно дією. Для ідентифікації нооксину відповідно до вимог ДФУ запропоновано використовувати ІЧ- та УФ-спектроскопію, тонкошарову хроматографію та хімічні реакції. Для кількісного визначення розроблено та валідовано титриметричну методику (кисотно-основне титрування у неводному середовищі).

Ключові слова: фармацевтичний аналіз, ідентифікація, кількісне визначення, Нооксин.

Бевз Н.Ю., Колесник С.В., Болотов В.В., Бисага Е.И. Разработка и валидация методик контроля качества оригинальной субстанции нооксин // Украинский медицинский альманах. – 2012. – Том 15, № 3. – С. 11-14.

Разработаны методики идентификации и количественного определения Нооксина – оригинальной субстанции ноотропного действия. Для идентификации нооксина в соответствии с требованиями ГФУ предложено использовать ИК- и УФ-спектроскопию, тонкослойную хроматографию и химические реакции. Для количественного определения разработана и валидирована титриметрическая методика (кислотно-основное титрование в неводной среде).

Ключевые слова: фармацевтический анализ, идентификация, количественное определение, Нооксин.

Bevz N.Yu., Kolisnyk S.V., Bolotov V.V., Bysaga Ye.I. Development and validation of quality control techniques for the original substance nooxin // Украинский медицинский альманах. – 2012. – Том 15, № 3. – С. 11-14.

The techniques of identification and quantification of Nooxine - the original substance with nootropic action have been developed. For identification of nooxine in accordance with the requirements of the SPhU have been proposed to use IR- and UV-spectroscopy, thinlayer chromatography and chemical reactions. For the quantitative determination the titrimetric method (acid-base titration in non-aqueous medium) has been developed and validated.

Key words: pharmaceutical analysis, identification, quantification, Nooxin.

Надійшла 22.03.2012 р.

Рецензент: проф. Л.В.Савченкова