УДК 615.07:54.062

І. Ю. Капустянський, С. М. Коваленко, Л. В. Євсєєва, Л. А. Ковпак

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ 6,7-ДИМЕТОКСИ-4-*N*-(4-ЦІАНОФЕНІЛ) АМІНОХІНАЗОЛІНУ

Розроблено методику кількісного визначення 6,7-диметокси-4-N-(4-ціанофеніл)амінохіназоліну в субстанції методом неводного потенціометричного титрування. Проведена валідація методики кількісного визначення за наступними характеристиками: правильність, точність, лінійність, діапазон застосування. Перевірені валідаційні характеристики відповідають критеріям прийнятності.

Ключові слова: 6,7-диметокси-4-N-(4-ціанофеніл)амінохіназолін, кількісне визначення, потенціометричне титрування, неводні розчинники, валідація.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ

Складовою частиною розробки нових субстанцій для фармацевтичного застосування є контроль якості та стандартизація активного фармацевтичного інгредієнту (АФІ). Нами було синтезовано 40 нових сполук, що належать до класів 4-арилокси- та 4-алкіл/ариламінохіназолінів як потенційних біологічно-активних речовин. Попереднє комп'ютерне прогнозування та подальші дослідження «in vitro» й «in vivo» дозволили виявити речовину з високою інгібуючою активністю щодо c-Jun N-кінцевих кіназ – 6,7-диметокси-4-N-(4-ціанофеніл)амінохіназолін. Для подальших досліджень необхідно провести комплекс робіт зі стандартизації цієї речовини як субстанції для фармацевтичного застосування. Згідно з вимогами Державної фармакопеї України (ДФУ), одним із основних показників якості субстанції є кількісний вміст діючої речовини, який для синтетичних субстанцій має бути не меншим за 98.5% [1].

АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

ДФУ для кількісного визначення основної речовини в субстанції для фармацевтичного застосування рекомендує використовувати прямі методи аналізу. Перевагами прямих методів аналізу над непрямими (метод стандарту) є те, що прямі методі є більш точними та здатними не перевищити допустиму невизначеність методики при допуску В=±1% та ±1,5%. До прямих методів належить метод потенціометричного титрування [7].

Азотовмісні гетероциклічні сполуки, до яких відноситься 6,7-диметокси-4-N-(4-ціанофеніл) амінохіназолін, зазвичай, визначають титруванням у середовищі неводних розчинників.

ВИДІЛЕННЯ НЕВИРІШЕНИХ РАНІШЕ ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ

У відповідності до вимог ДФУ, всі аналітичні методики, що входять до аналітичної нормативної документації (АНД) на фармацевтичну субстанцію або готову лікарську форму мають бути валідовані. В ДФУ запропонована стандартна процедура валідації та встановлені критерії прийнятності методик кількісного визначення основної речовини у субстанціях та готових лікарських формах [3-6]. Основні валідаційні параметри, зазначені в ДФУ, є специфічність, лінійність, правильність та прецизійність в визначеному діапазоні застосування.

ФОРМУЛЮВАННЯ ЦІЛЕЙ СТАТТІ

Метою даного дослідження була розробка та валідація методики кількісного визначення 6,7-диметокси-4-N-(4-ціанофеніл)амінохіназоліну методом потенціометричного титрування в середовищі неводного розчинника.

© Колектив авторів, 2015

ВИКЛАД ОСНОВНОГО МАТЕРІАЛУ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єкт дослідження: фармацевтична субстанція 6,7-диметокси-4-N-(4-ціанофеніл)амінохіназолін.

Розчинники та реактиви: кислота оцтова льодяна, кислота мурашина безводна, 0.1 М розчин кислоти хлорної (відповідають вимогами ДФУ).

Обладнання: аналітичні ваги Mettler Toledo AB 204, pH-метр «Seven Easy» фірми «Mettler Toledo» (Швейцария), з комбінованим скляним електродом із рухомою муфтою діафрагмою-шліфом для титрування в неводному середовищі, бюретки класу А.

В ході досліджень у якості розчинників нами було використано кислоту оцтову льодяну та кислоту мурашину безводну. У середовищі оцтової кислоти потенціометричне титрування виявилось неможливим - (6,7-диметокси-4-N-(4-ціанофеніл)амінохіназолін не повністю розчинявся в цьому середовищі, через що були отримані занижені результати кількісного вмісту діючої речовини. Оптимальним виявилось використання кислоти мурашиної безводної як неводного розчинника.

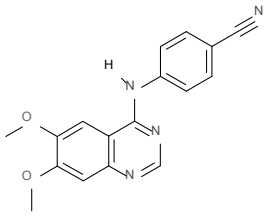

Рис. 1. *Формула 6,7-диметокси-4-N-(4-ціанофеніл)амінохіназоліну*

Визначення проводили за наступною методикою: 0.170 г (точна наважка) 6,7-диметокси-4-N-(4-ціанофеніл)амінохіназоліну ($C_{17}H_{14}N_4O_2$) розчиняли в 50 мл кислоти мурашиної безводної і титрували 0.1 М розчином кислоти хлорної (використовують бюретку місткістю 10 мл). Точку еквівалентності визначали потенціометрично за першим стрибком потенціалів на кривій титрування. Кількісний вміст основної речовини визначали враховуючи, що 1 мл 0.1 М розчину хлорної кислоти відповідає 30.63 мг $C_{17}H_{14}N_4O_2$.

Для валідації методики готували випробовувані модельні розчини у діапазоні застосування методики ±20% від робочої концентрації. Робоча концентрація (наважка) взята відповідно до рекомендацій [8] для субстанцій з допусками вмісту основної речовини ±1,5% – 170,0 мг, відповідно діапазон концентрацій становить – від 136,0 мг до 204,0 мг. Дослідження лінійності методики проведені одночасно з визначенням параметрів прецизійності і правильності на 9-ти модельних розчинах. Статистичну обробку експериментальних даних проводили відповідно до рекомендацій ДФУ «Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту» [4] та рекомендацій стандартизованих процедур [8]. Оцінку отриманих метрологічних характеристик проводили відповідно до критеріїв прийнятності валідаційних характеристик [5].

Для титрування використовують титрований 0.1 М розчин кислоти хлорної. Невизначеність концентрації титранту є систематичною похибкою для методики. Ця похибка повинна бути незначущою відповідно до максимально припустимої повної невизначеності методики – не повинна перевищувати значення 0,32* max$\Delta_{AS.}$ Для субстанцій з допусками вмісту основної речовини ±1,5% maxΔ_{AS} = 1,5.

Таблиця 1

ПОХИБКА ПРИ ВИЗНАЧЕННІ ПОПРАВКОВОГО КОЕФІЦІЄНТУ ДО ТИТРУ 0.1 М РОЗЧИНУ КИСЛОТИ ХЛОРНОЇ

№ п/п	Наважка калію гідрофталату, г	Об'єм, л	К
1	0,1462	7,15	1,002
2	0,1440	7,05	1,000
3	0,1428	7,00	0,999
4	0,1441	7,05	1,001
	Середнє значення		1,001
	S_0 (стандартне відхилення)		0,001
	RSD,%		0,13
	Δz (відносний довірчий інтервал)		0,30
	Критерій Δz ≤ 0,32*1,5=0,48		0,30 ≤ 0,48

Розрахунки параметрів лінійності, прецизійності та правильності методики у «нормалізованих» координатах наведені у табл. 2.

Відповідно до ДФУ критерії прийнятності методики кількісного визначення основної речовини у субстанціях з симетричними допусками вмісту ± 1,5% наступні:

максимально припустима повна невизначеність	max Δ_{AS}, %	1,5
вільний член лінійної залежності	|a|, %	2,4
залишкове стандартне відхилення	S_0, %	0,79
коефіцієнт кореляції	r	0,99833
максимальна похибка	max σ	0,48

Для оцінки лінійності методики отримані дані обробляли методом найменших квадратів для прямої $Y_i=b*x_i+a$ (рис. 2).

Таблиця 2

РЕЗУЛЬТАТИ ВИЗНАЧЕННЯ ПАРАМЕТРІВ ЛІНІЙНОСТІ, ПРЕЦИЗІЙНОСТІ ТА ПРАВИЛЬНОСТІ МЕТОДИКИ

Розчин №	Введено X_i, мг	Об'єм титранту, $V_{екв.}$, мл	Y_i, Знайдено Y_i, мг	$Z_i = Y_i / X_i * 100\%$
1	99,90	4,32	134,97	99,90
2	99,33	4,61	144,03	99,33
3	99,64	4,79	149,65	99,64
4	99,27	5,09	159,02	99,27
5	99,37	5,41	169,02	99,37
6	101,15	5,52	172,46	101,15
7	100,27	5,78	180,58	100,27
8	100,48	6,12	191,20	100,48
9	98,71	6,48	202,45	98,71
середнє значення $Z_{ср}$				99,79
S_0 (стандартне відхилення), %				0,74
відносний довірчий інтервал, $\Delta z = t(95\%,8) * S_0(\%) = 1,8595 * S_0(\%)$				1,38
похибка, $\delta = \lvert Z_{ср} - 100 \rvert$				0,21

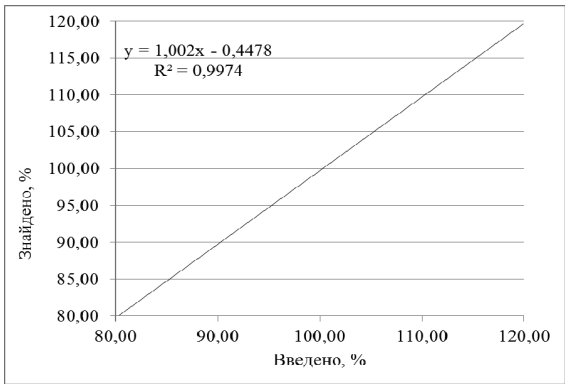

Рис. 2. *Графік лінійної залежності в нормалізованих координатах* $Y_i = b * x_i + a$.

Отримані розрахунки валідаційних параметрів методики (табл. 2) дозволяють порівняти їх з критеріями прийнятності для висновку щодо їх відповідності (табл. 3).

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ РОЗВІДОК

За результатами дослідження розроблена методика кількісного визначення основної речовини у новій фармацевтичній субстанції — 6,7-диметокси-4-N-(4-ціанофеніл)амінохіназоліні та проведена її валідація. Одержані результати свідчать, що всі розраховані валідаційні параметри методики відповідають критеріям прийнятності. Виходячи з цього, методика може бути використана для кількісного визначення 6,7-диметокси-4-N-(4-ціанофеніл)амінохіназоліну методом потенціометричного титрування у неводному середовищі.

Таблиця 3

ВІДПОВІДНІСТЬ РОЗРАХОВАНИХ ВАЛІДАЦІЙНИХ ПАРАМЕТРІВ МЕТОДИКИ КРИТЕРІЯМИ ПРИЙНЯТНОСТІ

Параметр	Критерій прийнятності	Розраховане значення параметру	Висновок
Лінійність:			
$\lvert a \rvert$	$\leq 2,4$	0,4478	Відповідає
S_0	$\leq 0,79$	0,48	Відповідає
r	$\geq 0,99833$	R^2=0,9974 r=0,9987	Відповідає
Правильність:			
статистична незначущість			
max σ	$\leq \Delta z / \sqrt{n} = 0,46$	0,21	Відповідає
практична незначущість			
max σ	$\leq max\ \Delta_{AS} * 0,32 = 0,48$	0,21	Відповідає
Прецизійність (збіжність):			
Δz	$\leq max\ \Delta_{AS} = 1,5$	1,38	Відповідає

За розробленою методикою було визначено вміст основної речовини у субстанції 6,7-диметокси-4-N-(4-ціанофеніл)амінохіназоліну, що становить (99,2±1,0) %. Кількісний вміст основної речовини відповідає вимогам, що висуваються до субстанцій для фармацевтичного застосування. Відхилення від середнього значення відповідає критеріям прийнятності результатів.

Розроблена методика кількісного визначення 6,7-диметокси-4-N-(4-ціанофеніл)амінохіназоліну в субстанції дозволяє стандартизувати АФІ для його подальших досліджень як фармацевтичної субстанції.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Субстанції для фармацевтичного застосування — Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. Доповнення 1 – Харків : РІРЕГ, 2004. — С. 275-281.
2. Леонтьев Д. А. Метрологический контроль качества результатов измерений / Д. А. Леонтьев, А. И. Гризодуб // Фармаком. – 2007. – № 2. – С. 16–25.
3. Державна Фармакопея України / Держ. п-во "Науково-експертний фармакопейний центр". – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556 с.
4. Державна Фармакопея України / Держ. п-во „Науково-експертний фармакопейний

центр". – 1-е вид., Доповнення 1. – Харків: РІРЕГ, 2004. – 520 с.
5. Державна Фармакопея України / Держ. п-во "Науково-експертний фармакопейний центр". – 1-е вид., Доп. 2. – Харків: 2008. – 620 с.
6. Державна Фармакопея України / Держ. п-во "Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів". – 1-е вид., Доп. 3. – Харків: 2009. – 280 с.
7. Державна Фармакопея України / Держ. п-во "Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів". – 1-е вид., Доповнення 4. – Харків: 2011. – 540 с.
8. Гризодуб А.И. Стандартизованная процедура валидации количественных методик титрования лекарственных средств / А. И. Гризодуб, Д. А. Леонтьев, Т. Н. Доценко //Фармаком. — 2009. — № 2. – С. 5-29

УДК 615.07:54.062

И. Ю. Капустянский, С. Н. Коваленко, Л. В. Евсеева, Л. А. Ковпак

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ 6,7-ДИМЕТОКСИ-4-*N*-(4-ЦИАНОФЕНИЛ)АМИНОХИНА-ЗОЛИНА

Разработана методика количественного определения 6,7 диметокси-4-N- (4-цианофенил) аминохиназолина в субстанции методом неводного потенциометрического титрования. Проведена валидация методики количественного определения по следующим характеристикам: правильность, точность, линейность, диапазон применения. Проверенные валидационные характеристики соответствуют критериям приемлемости.

Ключевые слова: 6,7-диметокси-4-N-(4-цианофенил)аминохиназолин, количественное определение, потенциометрическое титрование, неводные растворители, валидация.

УДК 615.07:54.062

I. Yu. Kapustianskyi, S.N. Kovalenko, L.V. Ievsieieva, L. A. Kovpak

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODS OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF 6,7-DIMETHOXY-4-N-(4-CYANOPHENYL)AMINO-QUINAZOLIN

Method of potentiometric titration has been developed for substance 6,7-dimethoxy-4-N-(4-cyanophenyl)aminoquinazoline. The method was validated and characteristics of accuracy, precision, linearity in the range of the working concentration have been calculated. The validation characteristics are conformed to the acceptable criterias.

Key words: 6,7-dimethoxy-4-N-(4-cyanophenyl)aminoquinazoline, assay, potentiometric titration, nonaqueous solvents, validation.

Адреса для листування:
61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4.
Кафедра управління якістю НФаУ
Тел. 68-56-71
E-mail: lar03@mail.ru

Надійшла до редакції:
04.05.2015 р.