

ДЕРБИСБЕКОВА У.Б.¹, ДАТХАЕВ У.М.¹, ЗАВАДА О.А.², ЖУРАВЕЛЬ И.А.³,

¹Казахский национальный медицинский университет имени С.Д. Асфендиярова, ²Харьковский медицинский университет, ³Харьковская медицинская академия последипломного образования, Украина

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБСТАНЦИИ

2-(6-ГИДРОКСИМЕТИЛ-9-МЕТИЛ-2-(4-ФТОРФЕНИЛ)-5Н-ПИРИДО[4,3,5,6]ПИРАНО[2,3-*D*]ПИРИМИДИН-4-ИЛСУЛЬФАНИЛ)-1-*N*-ПИПЕРИДИНИЛЭТАНОНА

Разработка и валидация методик количественного определения активного вещества в готовых лекарственных средствах и субстанциях для определенного анализа, которые не требуют значительного расхода реактивов, а также растворителей, продолжительного времени проведения анализа, позволяющие получать наиболее точный результат, продолжают оставаться одними из актуальных проблем медицины и фармацевтической химии.

АННОТАЦИЯ

В работе представлена методика количественного определения впервые синтезированной субстанции 2-(6-гидроксиметил-9-метил-2-(4-фторфенил)-5Н-пиридо[4,3,5,6]пирано[2,3-*d*]пиримидин-4-илсульфанил)-1-*N*-пиперидинилэтанона. Методика была валидирована по следующим параметрам: специфичность, линейность, правильность и прецизионность.

Ключевые слова: противогрибковые препараты, количественное определение, титрование, валидация методики, готовые лекарственные средства, субстанции.

ВВЕДЕНИЕ

Особое внимание при создании новых лекарственных препаратов уделяют вопросам стандартизации, которая подразумевает разработку аналитической нормативной документации, регламентирующей показатели качества и методики их определения на всех этапах жизненного цикла препарата [1,2].

Объектом нашего исследования стала впервые синтезированная субстанция 2-(6-гидроксиметил-9-метил-2-(4-фторфенил)-5Н-пиридо[4,3,5,6]пирано[2,3-*d*]пиримидин-4-илсульфанил)-1-*N*-пиперидинилэтанона (рисунок 1), проявляющая противогрибковую активность, перспективная как новый активный фармацевтический ингредиент [3-5].

С целью стандартизации исследуемого вещества была разработана методика количественного определения 2-(6-гидроксиметил-9-метил-2-(4-фторфенил)-5Н-пиридо[4,3,5,6]пирано[2,3-*d*]пиримидин-4-илсульфанил)-1-*N*-пиперидинилэтанона в субстанции, проведена ее валидация.

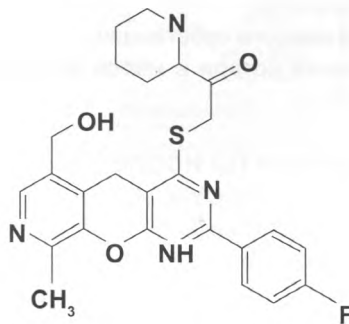


Рисунок 1 – Молекула 2-(6-гидроксиметил-9-метил-2-(4-фторфенил)-5Н-пиридо[4,3,5,6]пирано[2,3-*d*]пиримидин-4-илсульфанил)-1-*N*-пиперидинилэтанона

ЦЕЛЬ

Исходя из актуальности темы, целью работы была определена разработка методики количественного

определения субстанции 2-(6-гидроксиметил-9-метил-2-(4-фторфенил)-5*H*-пиридо[4,3,5,6]пирано[2,3-*d*]пиримидин-4-илсульфанил)-1-*N*-пиперидинилэтанона методом потенциометрического титрования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование: аналитические весы Mettler Toledo AB 204, рН-метр Seven Easy (Mettler Toledo, Швейцария) с комбинированным стеклянным электродом с подвижной муфтой, диафрагмой-шлифом для титрования в неводной среде, бюретки и мерная посуда (класс А).

Реактивы: метанол, уксусная кислота, хлорная кислота (в соответствии с требованиями ГФ РК) [1].

Методика количественного определения: 0,240 г субстанции растворяют в 20,0 мл метанола, перемешивают, прибавляют 30 мл уксусной кислоты, титруют 0,1 М раствором хлорной кислоты потенциометрически до первого скачка потенциалов на кривой титрования.

1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты соответствует 47,96 мг 2-(6-гидроксиметил-9-метил-2-(4-фторфенил)-5*H*-пиридо[4,3,5,6]пирано[2,3-*d*]пиримидин-4-илсульфанил)-1-*N*-пиперидинилэтанона.

Содержание действующего вещества в субстанции (в процентах) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{V \cdot 0,047958 \cdot K \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot (100 - W)};$$

где:

V – объем 0,1 М раствора хлорной кислоты, израсходованный на титрование испытуемого раствора, мл;

K – поправочный коэффициент;

0,047958 – количество грамм 2-(6-гидроксиметил-9-метил-2-(4-фторфенил)-5*H*-пиридо[4,3,5,6]пирано[2,3-*d*]пиримидин-4-илсульфанил)-1-*N*-пиперидинилэтанона, соответствующее 1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты;

m – масса навески субстанции;

W – значение потери в массе при высушивании субстанции, %.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

При разработке методики количественного определения 2-(6-гидроксиметил-9-метил-2-(4-фторфенил)-5*H*-пиридо[4,3,5,6]пирано[2,3-*d*]пиримидин-4-илсульфанил)-1-*N*-пиперидинилэтанона в субстанции использованы подходы международных фармакопей. Выбран прямой метод определения – потенциометрическое титрование (как обеспечивающий высокую чувствительность и точность).

Подбор растворителя для определения проводили с учетом того, что анализируемая субстанция проявляет слабо основные свойства. Оптимальны-

ми растворителями для подобных веществ являются безводные органические кислоты, такие как муравьиная или уксусная. В нашем случае наиболее приемлемой оказалась смесь растворителей, то есть метанола и уксусной кислоты. В результате нами была предложена методика количественного определения 2-(6-гидроксиметил-9-метил-2-(4-фторфенил)-5*H*-пиридо[4,3,5,6]пирано[2,3-*d*]пиримидин-4-илсульфанил)-1-*N*-пиперидинилэтанона в субстанции методом неводного потенциометрического титрования с использованием в качестве титранта хлорной кислоты.

Как известно, при разработке методики обязательной является её валидация, которая проводится для подтверждения соответствия методики заранее выбранным критериям пригодности. Валидационными характеристиками метода количественного определения в соответствии с требованиями ГФ РК являются специфичность, линейность, правильность, прецизионность, сходимость (повторяемость) и внутрилабораторная прецизионность.

Предварительно нами был осуществлен расчет полной прогнозируемой неопределенности методики. Для этого была рассчитана неопределенность пробоподготовки (стадии взвешивании и разведения) и неопределенность конечной аналитической операции с учетом допуска содержания ($B = \pm 1,5\%$) (таблица 1).

Таблица 1 – Результаты расчета неопределенности методики анализа

| Фактор | Расчет неопределенности, % |
|---|---|
| Пробоподготовка: • взятие навески 240 мг | $\Delta_{m1} = 0,2/240 \cdot 100\% = 0,083$ |
| Конечная аналитическая операция: • неопределенность концентрации 0,1 М раствора хлорной кислоты: навеска калия гидрофталата РО при установлении титра 0,1 М раствора хлорной кислоты (350 мг); • установление титра (бюретка 25 мл с неопределенностью 0,05 мл); • неопределенность титрования субстанции (бюретка 25 мл с неопределенностью 0,05 мл) | $\Delta_{m2} = 0,2/350 \cdot 100\% = 0,057$ $\Delta_{v1} = 0,05/25 \cdot 100\% = 0,2$ $\Delta_{v2} = 0,05/25 \cdot 100\% = 0,2$ |

Из полученных данных видно, что полная прогнозируемая неопределенность разработанной методики не превышает 1,5, что соответствует критериям приемлемости.

Специфичность методики исследовали по влиянию компонентов холостого раствора (метанол и уксусная кислота). При титровании холостого раствора был израсходован объем титранта, составляющий одну каплю ($\leq 0,05$ мл). Так подтверждено, что компоненты холостого раствора не влияют на результаты титрования, и методика характеризуется допустимой специфичностью (таблица 2).

При проведении количественного определения 2-(6-гидроксиметил-9-метил-2-(4-фторфенил)-5*H*-пиридо[4,3,5,6]пирано[2,3-*d*]пиримидин-4-илсульфанил)-1-*N*-пиперидинилэтанона методом неводного по-

тенциометрического титрования диапазон применения составил от 80 до 120% от номинального содержания основного вещества в субстанции.

Таблица 2 – Влияние компонентов холостого раствора на результаты определения

| № | Объем титранта, который был потрачен на титрование, мл | |
|---|--|--------------------|
| | «Холостой» раствор | Испытуемый раствор |
| 1 | 1 капля (≤0,05 мл) | 5.03 |
| 2 | 1 капля (≤0,05 мл) | 5.05 |
| 3 | 1 капля (≤0,05 мл) | 5.04 |

Валидационные характеристики методики – линейность, правильность, прецизионность (сходимость) – изучали одновременно на девяти модельных растворах с концентрацией 2-(6-гидроксиметил-9-метил-2-(4-фторфенил)-5H-пиридо[4,3,5,6]пирано[2,3-d]пиримидин-4-илсульфанил)-1-N-пиперидинилэтанона от 80 до 120% от номинального содержания, указанного в методике, с шагом в 5% [6]. Результаты расчетов приведены в таблице 3. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили в соответствии с рекомендациями ГФ РК «Статистический анализ результатов химического эксперимента» [1] и рекомендаций стандартизированных процедур [6].

Таблица 3 – Результаты валидации методики количественного определения (диапазон 80-120%, шаг – 5%, P=95%, n=9)

| Раствор № | Введено X _i , г | Объем титранта, V _{титр} , мл | Y _i , найдено, г | Z = Y _i /X _i •100% |
|--|----------------------------|--|-----------------------------|--|
| 1 | 0,192 | 4,01 | 0,192 | 99,90 |
| 2 | 0,205 | 4,31 | 0,207 | 101,07 |
| 3 | 0,218 | 4,55 | 0,218 | 100,03 |
| 4 | 0,230 | 4,82 | 0,231 | 100,48 |
| 5 | 0,240 | 5,05 | 0,242 | 100,80 |
| 6 | 0,251 | 5,25 | 0,252 | 100,21 |
| 7 | 0,264 | 5,46 | 0,262 | 99,16 |
| 8 | 0,276 | 5,76 | 0,276 | 100,00 |
| 9 | 0,288 | 6,03 | 0,289 | 100,34 |
| Среднее значение Z _{ср} | | | | 100,22 |
| S ₀ (стандартное отклонение), % | | | | 0,554 |
| Относительный доверительный интервал, Δ _z =(95%,8)•S ₀ (%)=1,8595•S ₀ (%) | | | | 1,031 |
| Ошибка, δ = Z _{ср} -100 | | | | 0,22 |

Линейную зависимость рассчитывали методом наименьших квадратов $Y_i = b \cdot X_i + a$, где X_i – концентрация основного вещества в процентах от номинальной, Y_i – объем титранта в процентах от теоретического. График сохраняет линейную зависимость во всем интервале исследуемых концентраций (рисунок 2). Параметры линейности соответствуют критериям приемлемости для методик количественного определения с допусками содержания основного вещества: $V = \pm 1,5\%$ (таблица 3).

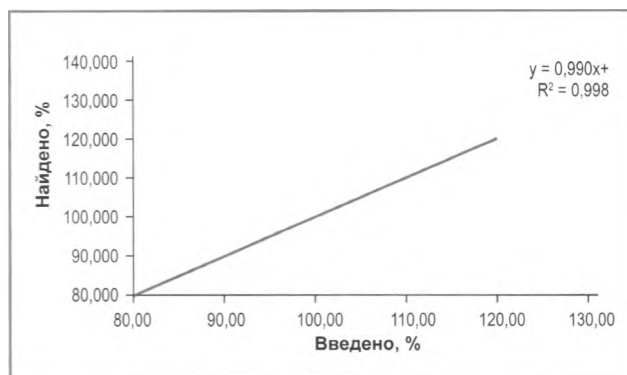


Рисунок 2 – График зависимости объема титранта от концентрации 2-(6-гидроксиметил-9-метил-2-(4-фторфенил)-5H-пиридо[4,3,5,6]пирано[2,3-d]пиримидин-4-илсульфанил)-1-N-пиперидинилэтанона в нормализованных координатах

Определение правильности и сходимости разработанной методики проводили на тех же модельных растворах. Заключение о соответствии валидационных параметров методики было сделано на основании сравнения их с критериями приемлемости (таблица 4).

Из данных таблиц 3 и 4 видно, что методика характеризуется достаточной сходимостью и правильностью в диапазоне исследуемых концентраций. Значение относительного доверительного интервала ($\Delta_z = 1,031\%$) меньше критического значения для сходимости результатов (1,5%). Систематическая погрешность методики $\delta = 0,22\% < 0,48$, то есть практически не значима.

Таблица 4 – Соответствие рассчитанных валидационных параметров методики критериям приемлемости

| Параметр | Критерий приемлемости | Рассчитанное значение параметра | Вывод |
|------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|---------------|
| Линейность | | | |
| a | ≤ 2,4 | 1,182 | Соответствует |
| S ₀ | ≤ 0,79 | 0,554 | Соответствует |
| r | ≥ 0,99833 | R ² =0,9984 r=0,9992 | Соответствует |
| Правильность | | | |
| Статистическая незначимость | | | |
| max σ | ≤ Δ _z /√n=0,32 | 0,22 | Соответствует |
| Практическая незначимость | | | |
| max σ | ≤ max Δ _{AS} •0,32=0,48 | 0,22 | Соответствует |
| Прецизионность (сходимость) | | | |
| Δ _z | ≤ max Δ _{AS} =1,5 | 1,031 | Соответствует |

Полученные экспериментальные данные и проведенные на их основе расчеты указывают на то, что все исследуемые валидационные параметры разработанной методики соответствуют необходимым критериям приемлемости.

ВЫВОДЫ

1. Разработана методика количественного определения основного вещества в субстанции 2-(6-гидроксиметил-9-метил-2-(4-фторфенил)-5H-пиридо[4,3,5,6]пирано[2,3-d]пиримидин-4-илсульфанил)-1-N-пиперидинилэтанона методом потенциометрического титрования.

Проведена валидация разработанной методики и установлено, что методика может быть использована для количественного определения основного вещества в субстанции 2-(6-гидроксиметил-9-метил-2-(4-фторфенил)-5H-пиридо[4,3,5,6]пирано[2,3-d]пиримидин-4-илсульфанил)-1-N-пиперидинилэтанона и может быть рекомендована для включения в аналитическую нормативную документацию.

SUMMARY

DERBISBEKOVA U.B.¹, DATKHAYEV U.M.¹,
ZAVADA O.A.², ZHURAVEL I.A.³,

¹Kazakh National University named after
S.D. Asfendiyarov, ²Kharkov Medical University,

³Kharkov Medical Academy of
Postgraduate Education, Ukraine

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE SUBSTANCE 2-(6-HYDROXYMETHYL-9-METHYL-2-(4-FLUOROPHENYL)-5H-PYRIDO[4,3,5,6]PIRANO[2,3-D]-PYRIMIDINE-4-ILSULPHANIL)-1-N-PIPERIDINYLETHANE

The method of quantitative determination of the first synthesized substance of 2-(6-hydroxymethyl-9-methyl-2-(4-fluorophenyl)-5H-pyrido[4,3,5,6]pyrano[2,3-d]pyrimidine-4-ilsulfanyl)-1-N-piperidinyethanone. The methodology was validated according to the following parameters: specificity, linearity, accuracy and precision.

Keywords: antifungal preparations, quantitative determination, titration, method validation, medicines, substance.

Литература:

1. Государственная фармакопея Республики Казахстан, Т. 1. – Алматы: Издательский дом «Жибек жолы», 2008, 592 с.
2. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств: Методические рекомендации. / Н.В. Юргель. – М.: Издательство «Спорт и Культура – 2000», 2007, 48 с.
3. Фармацевтический гель с противогрибковым действием. / У.Б. Дербисбекова, У.М. Датхаев, И.А. Журавель, Е.В. Глазух, Г.О. Устенова, К.К. Кожанова. // Патент Республики Казахстан на полезную модель KZ (13)U(11)2239, МПК: C07D 404/14; заявление 15.09.2016; опубл. 30.06.2017, Бюл. №12, 4 с.
4. Изучение реологических свойств геля под условным названием «Антикандид». / У.Б. Дербисбекова, У.М. Датхаев, И.А. Журавель, А.С. Калыкова. – Вестник Алматинского технологич. ун-та. – 2016 – №4 – С. 85-89.
5. Antifungal activity of "Antikandid" gel. / U.B. Derbisbekova, U.M. Datkhayev, I.O. Zhuravel, S.B. Abdykerimova. – Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2016. – V. 7, №6. – С. 1803-1808.
6. Стандартизованная процедура валидации количественных методик титрования лекарственных средств. / А.И. Гризодуб, Д.А. Леонтьев, Т.Н. Доценко, В.А. Загорий. – Фармаком. – 2009. – №2. – С. 5-29.

БЕЗОПАСНОСТЬ ЛЕКАРСТВ

Сообщения о развитии остеонекроза наружного слухового прохода у больных, получающих деносумаб

Национальное фармацевтическое агентство Великобритании сообщает об ассоциации между препаратом деносумаб и риском развития остеонекроза челюсти, остеонекроза наружного слухового прохода.

Деносумаб представляет собой человеческое моноклональное IgG2 антитело. Инъекционная форма препарата деносумаб в дозе 60 мг (Пролиа) одобрена для терапии остеопороза у женщин в постменопаузе и мужчин с повышенным риском переломов, а также для лечения снижения костной ткани, ассоциированной с гормональной терапией у мужчин с раком предстательной железы и повышенным риском переломов.

Деносумаб. выпускаемый в виде раствора для инъекций, 120 мг (Эксджива), имеет следующие показания:

- профилактика событий со стороны скелетной системы (патологические переломы, радиотерапия костей, компрессия спинного мозга или операции на костях) у взрослых с солидными опухолями с метастазами в кости;

- гигантоклеточные опухоли костей у взрослых и подростков со сформировавшимся скелетом, которые являются нерезектабельными или в случае, если хирургическое вмешательство приведет к серьезным последствиям.



internist.ru