

ТКАЧЕНКО П.В.¹, КОЛЕСНИК С.В.¹, ЖУРАВЕЛЬ И.А.², ЗАВАДА О.А.³, ДЕРБИСБЕКОВА У.Б.⁴,

¹Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, ²Харьковская медицинская академия последипломного образования, ³Харьковский медицинский университет, Украина, ⁴Казахский национальный медицинский университет имени С.Д. Асфендиярова

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБСТАНЦИИ

4-(4-ХЛОРФЕНИЛ)СУЛЬФО-3-ЭТИЛТИО-5-АМИНОПИРАЗОЛА

Одна из ключевых задач медицинской химии – поиск новых активных фармацевтических ингредиентов (АФИ), обладающих значительным терапевтическим эффектом и минимальным побочным действием. Разработка противомикробных или противогрибковых средств, кроме всего прочего, требует постоянного обновления линейки молекул, что обусловлено устойчивостью микроорганизмов к существующим препаратам, их непрерывной эволюцией, появлением устойчивых мутаций и новых штаммов возбудителей бактериальных инфекций и микозов и на сегодняшний день является одной из самых актуальных тем [1-4].

АННОТАЦИЯ

Разработана методика количественного определения субстанции 4-(4-хлорфенил)сульфо-3-этилтио-5-аминопиразола методом неводного потенциометрического титрования. Определены валидационные характеристики методики и экспериментально подтверждено их соответствие критериям приемлемости.

Ключевые слова: показатели качества субстанции, неводное потенциометрическое титрование, количественное определение, валидация, производные 5-аминопиразола.

ВВЕДЕНИЕ

В предыдущих работах нами описан синтез 4-(4-хлорфенил)сульфо-3-этилтио-5-аминопиразола [5,6]. Последующее изучение биологической активности показало, что соединение проявляет фунгицидную и фунгистатическую активность и может быть использовано для применения в качестве активной субстанции в фармацевтических композициях с антимикотическим действием.

Качество лекарственного препарата должно контролироваться на всех этапах его жизненного цикла, поэтому одним из ключевых элементов создания нового АФИ является разработка методик контроля качества субстанции, в частности, количественное определение действующего вещества.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка и валидация методики количественного определения субстанции 4-(4-хлорфенил)сульфо-3-этилтио-5-аминопиразола с использованием метода неводного потенциометрического титрования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования – вновь синтезированная субстанция 4-(4-хлорфенил)сульфо-3-этилтио-5-аминопиразола.

Реактивы: уксусная, хлорная кислоты (в соответствии с требованиями ДФУ).

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате изучения физико-химического поведения субстанции 4-(4-хлорфенил)сульфо-3-этилтио-

5-аминопиразола (рисунок 1) в различных растворителях для ее количественного определения нами предложено потенциометрическое неводное титрование в среде уксусной кислоты с использованием в качестве титранта хлорной кислоты.

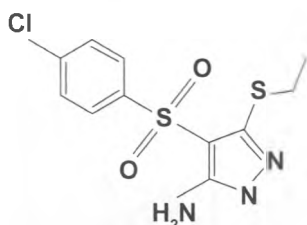


Рисунок 1 – Молекула 4-(4-хлорфенил)сульфо-3-этилтио-5-аминопиразола

Методика количественного определения: 0,200 г субстанции растворяют в 50,0 мл уксусной кислоты и титруют 0,1 М раствором хлорной кислоты потенциометрически [7] до первого скачка потенциалов на кривой титрования.

1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты соответствует 31,78 мг 4-(4-хлорфенил)сульфо-3-этилтио-5-аминопиразола.

Содержание 4-(4-хлорфенил)сульфо-3-этилтио-5-аминопиразола в субстанции (в процентах) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{V \cdot 0,03178 \cdot K \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot (100 - W)};$$

где:

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

K – поправочный коэффициент;

0,03178 – количество грамм 4-(4-хлорфенил)сульфо-3-этилтио-5-аминопиразола, соответствующее 1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты;

m – масса навески субстанции;

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

Обязательным условием, подтверждающим пригодность предложенной методики, является её валидность. Предварительно, для оценки корректности воспроизведения разработанной методики количественного определения в другой лаборатории, был осуществлен расчет полной прогнозируемой неопределенности. Определение проводили путем расчета неопределенности пробоподготовки (стадии взвешивания и разведения) и неопределенности конечной аналитической операции с учетом допуска содержания активного вещества ($B = \pm 1,5\%$) (таблица 1).

Таким образом, полная прогнозируемая неопределенность разработанной методики не превышает 1,5, что соответствует критериям приемлемости.

Таблица 1 – Расчет неопределенности методики анализа

Фактор	Расчет неопределенности, %
Пробоподготовка: • взятие навески 200 мг	$\Delta_{m1} = 0,2/200 \cdot 100\% = 0,1$
Конечная аналитическая операция: • неопределенность концентрации 0,1 М раствора хлорной кислоты: навеска калия гидрофталата PO 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)	$\Delta_{m2} = 0,2/350 \cdot 100\% = 0,057$ $\Delta_{v1} = 0,05 \cdot 25/100 = 0,2$ $\Delta_{v2} = 0,05 \cdot 25/100 = 0,2$

Специфичность аналитической методики устанавливали по результатам изучения влияния компонентов холостого раствора (уксусная кислота) на результаты определения. Так, на титрование холостого раствора тратится объем титранта, равный одной капле ($\leq 0,05$ мл), что не влияет на результаты измерения, и методика характеризуется достаточной специфичностью. Результаты определения специфичности обобщены в таблице 2.

Таблица 2 – Влияние компонентов холостого раствора на результаты определения

№	Объем титранта, который был потрачен на титрование, мл	
	«Холостой» раствор	Испытуемый раствор
1	1 капля ($\leq 0,05$ мл)	6.33
2	1 капля ($\leq 0,05$ мл)	6.35
3	1 капля ($\leq 0,05$ мл)	6.34

Таблица 3 – Результаты определения параметров линейности, прецизионности и правильности методики

Раствор №	Введено X_i , г	Объем титранта, $V_{\text{окв}}$, мл	Y_i , найдено, г	$Z = Y_i/X_i \cdot 100\%$
1	0,162	5,09	0,162	99,94
2	0,172	5,41	0,172	100,29
3	0,181	5,73	0,182	100,33
4	0,199	6,33	0,200	100,50
5	0,201	6,36	0,202	100,65
6	0,221	6,99	0,222	100,24
7	0,221	6,99	0,222	100,45
8	0,240	7,61	0,241	100,37
9	0,240	7,61	0,239	99,54
Среднее значение Z_{cp}				100,26
S_0 (стандартное отклонение), %				0,332
Относительный доверительный интервал, $\Delta_z = t(95\%, 8) \cdot S_0(\%) = 1,8595 \cdot S_0(\%)$				0,618
Ошибка, $\delta = Z_{\text{cp}} - 100 $				0,26

Линейность, правильность и прецизионность (сходимость) методики изучали на 9-ти модельных растворах с концентрацией действующего вещества от 80 до 120% от номинального содержания, указанного в методике, с шагом в 5% [8]. Результаты расчетов пара-

метров приведены в таблице 3. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили в соответствии с рекомендациями ГФУ – «Статистический анализ результатов химического эксперимента» [7] и рекомендаций стандартизированных процедур [8,9].

Для оценки линейности методики полученные данные обрабатывали методом наименьших квадратов для прямой $Y_i = b \cdot X_i + a$. График сохраняет линейную зависимость во всем интервале исследуемых концентраций (рисунок 2), а рассчитанные параметры линейности соответствуют критериям приемлемости для методик количественного определения с допусками содержания основного вещества $V = \pm 1,5\%$ (таблица 3).

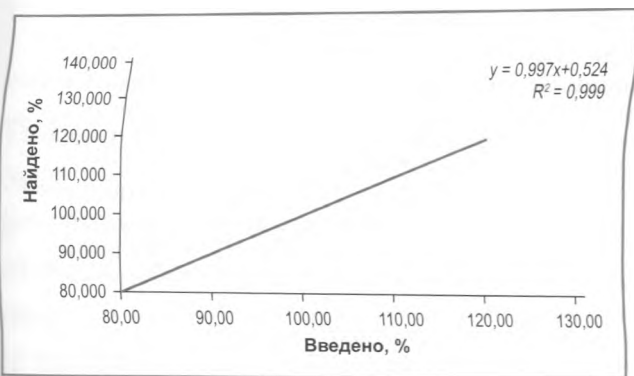


Рисунок 2 – График зависимости объема титранта от концентрации 4-(4-хлорфенил)сульфо-3-этилтио-5-аминопиразола в нормализованных координатах

Таблица 4 – Соответствие рассчитанных валидационных параметров методики критериям приемлемости

Параметр	Критерий приемлемости	Рассчитанное значение параметра	Вывод
Линейность			
a	≤ 2,4	0,5248	Соответствует
S ₀	≤ 0,79	0,332	Соответствует
r	≥ 0,99833	R ² =0,9994 r=0,9997	Соответствует
Правильность			
Статистическая незначимость			
max σ	≤ Δ _z /√n=0,32	0,26	Соответствует
Практическая незначимость			
max σ	≤ max Δ _{AS} •0,32=0,48	0,26	Соответствует
Прецизионность (сходимость)			
Δ _z	≤ max Δ _{AS} =1,5	0,618	Соответствует

Литература:

1. National Summary Data on Antibiotic Resistance in the U.S, 2013, [Электронный ресурс]: <http://www.cdc.gov>. [Режим доступа]: <http://www.cdc.gov/media/releases/2013/p0916-untreatable.html>.
2. Nosocomial infection and its molecular mechanisms of antibiotic resistance / J. Xia, J. Gao, W. Tang. – Biosci Trends. – 2016. – №10 (1). – P. 14-21. Doi: 10.5582/bst.2016.01020.
3. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. – WHO, Geneva, Switzerland, 2014.
4. Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment and human health. / H. Radhouani, N. Silva, P. Poeta, C. Torres, S. Correia, G. Igrejas. – Front Microbiol. – 2014. – №5. – P. 1-12.

Определение правильности и сходимости разработанной методики проводили на основании тех же результатов для модельных растворов. Полученные данные были статистически обработаны, сравнивались с критериями приемлемости (таблица 4). Из данных таблиц 3 и 4 видно, что методика характеризуется достаточной сходимостью и правильностью в диапазоне исследуемых концентраций. Найденное значение относительного доверительного интервала Δ_z=0,618% меньше критического значения для сходимости результатов (1,5%). Систематическая погрешность методики δ=0,26 < 0,48, то есть практически незначима. Критерии сходства методики (статистическая и практическая незначимость) выполняются.

ВЫВОДЫ

Разработана методика количественного определения основного вещества вновь синтезированной субстанции 4-(4-хлорфенил)сульфо-3-этилтио-5-аминопиразола. Проведенные исследования подтвердили соответствие валидационных характеристик методики критериям приемлемости.

SUMMARY

TKACHENKO P.V.¹, KOLESNIK S.V.¹,
ZHURAVEL I.A.², ZAVADA O.A.³,
DERBISBEKOVA U.B.⁴,

¹National Pharmaceutical University, Kharkov, ²Kharkov Medical Academy of Postgraduate Education, ³Kharkov Medical University, Ukraine, ⁴Kazakh National Medical University named after S.D. Asfendiyarov

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE SUBSTANCE OF 4-(4-CHLOROPHENYL)SULPHO-3-ETHYLTHIO-5-AMINOPYRAZOLE

A procedure for the quantitative determination of the substance 4-(4-chlorophenyl)sulfo-3-ethylthio-5-aminopyrazole by the method of non-aqueous potentiometric titration was developed. The validation characteristics of the method were determined and their compliance with the acceptance criteria was experimentally confirmed.

Keywords: substance quality indicators, non-aqueous potentiometric titration, quantitative determination, validation, 5-aminopyrazole derivatives.

5. The synthesis of the substituted 4-alkyl/arylsulfonyl-5-amino-3-alkylthiopyrazoles as promising pharmaceutical agents with the antifungal action. / P.V. Tkachenko, O.V. Tkachenko, K.Yu. Netosova, O.V. Borisov, I.O. Zhuravel. – Вестник фармации (Украина). – 2017. – №2. – С. 1-6.

6. Синтез и противомикробная активность 4-арилсульфонилпроизводных 5-аминопиразолов. / П.В. Ткаченко, Е.В. Ткаченко, И.А. Журавель, В.В. Казмирчук, У.Б. Дербисбекова. – Вестник КазНМУ. – 2017 – №2. – С. 317-321.

7. Субстанции для фармацевтического применения. – Государственная Фармакопея Украины. / ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр». – 1-е вид. Дополнения 1. – Харьков: PIPEG, 2004. – С. 275-281.

8. 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.

9. Метрологический контроль качества результатов измерений. / Д.А. Леонтьев, А.И. Гризодуб. – Фармаком. – 2007. – №. – С. 16-25.

ВРАЧУ НА ЗАМЕТКУ!

ПОВСЕДНЕВНЫЕ ТОВАРЫ, ОПАСНЫЕ ДЛЯ ЗДОРОВЬЯ

Из-за интенсивного использования бытовой химии возникают аллергии, повреждения дыхательных путей, кожные заболевания, гипертония. Ежедневно наше тело контактирует с 500 химическими соединениями, которые различным образом оказывают на нас влияние.

Самыми опасными являются спреи и стиральные порошки. В августе в Российской Федерации шесть наименований детских порошков было включено в «чёрный список».

Росконтроль проверил образцы детских порошков, главное нарушение – превышение индекса токсичности. В исследовании Росконтроля приняли участие 6 видов стиральных порошков: «Пемос Детский», «Ушастый нянь», «Аистёнок», Persil Expert Sensitive, «Досенька», Tide «Детский».

Важнейшим показателем безопасности моющего средства выступает индекс токсичности. Он показывает, насколько средство опасно для здоровья.

Для детских порошков установлены пределы этого показателя: от 70 до 120% (норматив указан в Единых санитарно-эпидемиологических и гигиенических требованиях к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю), утвержденных решением комиссии Таможенного союза 28.05.2010 г.).

У всех протестированных образцов обнаружена максимальная степень нарушения по токсичности. Худший результат по токсичности показал «Пемос Детский» – 31%. Индекс токсичности порошка «Ушастый нянь» составил 40%, что также находится вне пределов допустимых значений. У «Аистёнка» этот показатель оказался на уровне 39%, кроме этого эксперты отметили резкий неприятный запах. Persil Expert Sensitive показал индекс токсичности в 42%. Также этот образец среди всех протестированных порошков показал максимальное значение по токсичным анионным ПАВ (238±38 мг/л), остающимся после стирки. У «Досеньки» индекс токсичности оказался 41%, а у Tide «Детский» – 47%.

Заключение экспертов однозначно по всем образцам: «По результатам определения индекса токсичности не может использоваться для стирки детского белья».

Российские эксперты также проверили женские прокладки импортных и отечественных производителей на безопасность и способность «дышать». Специалисты Роскачества совместно с немецкими коллегами в области сравнительных потребительских испытаний и гинекологами исследовали 31 образец прокладок, произведённых в России и за рубежом. В итоге только треть образцов признана качественным товаром.

Результаты исследования приведены на сайте ведомства. Специалисты проверяли продукцию по 41-му критерию.

В группу товаров повышенного качества попали образцы брендов Хаммингс Делайт, Натали, ЭКОномочка део, Bella, BIBI и OLA. Также качественной признана продукция брендов Organus, Always, Clever, Милана.

Все остальные образцы были отнесены в группу товаров с нарушениями Единых санитарных эпидемиологических и гигиенических требований. В образце La Fresh были обнаружены энтеробактерии, в образце Normal Clinic – золотистый стафилококк, а в изделиях «Я-НЯНЯ», Libresse, Naturella, Ria – плесневые грибы.

Эксперты констатируют, что такая продукция потенциально может негативно отразиться на женском здоровье.

Предположительно, патогенные микроорганизмы могли быть занесены на различных этапах производства, при упаковке либо хранении товара, в результате человеческого фактора.

Исследователи также обнаружили повышенный уровень изменения pH, что может вызывать изменения в микрофлоре и привести к заболеванию.

Ксения МАКСИМОВА, Елена ЗАЙГРАЕВА,
sibmeda.ru