

## РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО СОЕДИНЕНИЯ *N*-(2-[4-ОКСО-3(4*H*)-ХИНАЗОЛИНИЛ]ПРОПИОНИЛ)ГУАНИДИНА

**Е.В. Компанцева, Д.Н. Луценко, А.А. Глушко**

Пятигорский медико-фармацевтический институт — филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, Пятигорск

Для цитирования: Компанцева Е.В., Луценко Д.Н., Глушко А.А. Разработка и валидация методики количественного определения биологически активного соединения *N*-(2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил)гуанидина // Аспирантский вестник Поволжья. – 2019. – № 5–6. – С. 122–127. <https://doi.org/10.17816/2072-2354.2019.19.3.122-127>

Поступила: 02.07.2019

Одобрена: 21.08.2019

Принята: 17.09.2019

▪ В данной работе представлены результаты выбора и обоснования условий определения спектрофотометрическим методом нового биологически активного соединения (БАС) VMA-13-15, представляющего собой *N*-(2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил)гуанидина. С использованием полученных расчетным путем значений констант ионизации БАС в качестве растворителя предложено использовать воду очищенную. В качестве аналитической длины волны выбран максимум светопоглощения при 266 нм. Это обосновано тем, что в водных растворах БАС существует на 99 % в виде молекулярной формы, что позволяет определять его с относительной погрешностью 1,29 % и с наименьшим количеством разведений. В результате исследования показано, что предложенная методика специфична, линейна в области аналитических концентраций 0,001–0,004 %, а также прецизионна и правильна, что подтверждает возможность ее использования для количественного определения.

▪ **Ключевые слова:** субстанция; УФ-спектрофотометрия; валидация.

## DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODS OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUND *N*-(2-[4-OXO-3(4*H*)-QUINAZOLINYL]PROPIONYL)GUANIDINE

**E.V. Kompantseva, D.N. Lutsenko, A.A. Glushko**

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, a Branch of Volgograd State Medical University, Pyatigorsk

For citation: Kompantseva EV, Lutsenko DN, Glushko AA. Development and validation of methods of quantitative determination of biologically active compound *N*-(2-[4-oxo-3(4*H*)-quinazoliny]propionyl)guanidine. *Aspirantskiy Vestnik Povolzh'ya*. 2019;(5-6):122-127. <https://doi.org/10.17816/2072-2354.2019.19.3.122-127>

Received: 02.07.2019

Revised: 21.08.2019

Accepted: 17.09.2019

▪ This paper presents the results of the selection and justification of the conditions for determination of a new biologically active compound (BAC) VMA-13-15, which is *N*-(2-[4-oxo-3(4*H*)-quinazoliny]propionyl)guanidine by means of the spectrophotometry. By using the calculated values of BAC ionization constants, it was proposed to use purified water as a solvent. The maximum light absorption at 266 nm was chosen as the analytical wavelength. This was justified by the fact that in aqueous solutions 99% BAC are in the molecular form, which allows to determine it with the error limit of 1.29%, and with the least amount of dilutions. The study showed that the proposed method is specific and linear in the analytical concentration of 0.001–0.004%, as well as it is precise and correct, which confirms the possibility of its use for quantitative determination.

▪ **Keywords:** substance; UV-spectrophotometry; validation.

### Введение

При создании новых лекарственных препаратов особое внимание уделяют вопросам стандартизации, которая подразумевает разработку нормативной документации, ре-

гламентирующей показатели качества и методики их определения на всех этапах жизненного цикла препарата. Объектом нашего исследования стало впервые синтезированное в ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России

биологически активное соединение (БАС) — *N*-(2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил)-гуанидин (VMA-13-15) (см. рисунок), проявляющее кардиопротекторную и нейропротекторную активность, перспективное для создания эффективных лекарственных препаратов [3].

Одним из этапов создания нормативной документации на новое лекарственное средство является разработка методик количественного определения действующего вещества в фармацевтической субстанции. Доступным и надежным методом анализа качества лекарственных средств признана УФ-спектрофотометрия в видимой и ультрафиолетовой областях спектра [4].

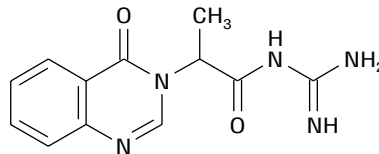
**Цель исследования** — выбор и обоснование условий определения содержания биологически активного соединения VMA-13-15 спектрофотометрическим методом.

### Материалы и методы исследования

Исследования проведены на 3 сериях лабораторных образцов БАС VMA-10-15. В работе использовали мерную посуду класса А, аналитические весы Госметр ВЛ-124. Измерение электронных спектров в УФ-области проводили на спектрофотометре СФ-2000. В качестве стандартного образца (СО) использовали дважды перекристаллизованный и высушенный до постоянной массы порошок *N*-(2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил)гуанидина.

Для измерения УФ-спектров нами были приготовлены растворы по следующей методике: около 0,05 г (точная навеска) СО БАС помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляют 30 мл соответствующего растворителя, взбалтывают до полного растворения и доводят этим же растворителем до метки (раствор А). При измерении спектра в области 250–280 нм 2 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят до метки соответствующим растворителем. При измерении оптической плотности в области 220–240 нм 10 мл раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят соответствующим растворителем до метки (раствор Б), затем 2 мл раствора Б помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и далее поступают, как описано выше. В качестве раствора сравнения используют соответствующий растворитель.

Методика количественного определения БАС: около 0,05 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и далее готовят растворы А и Б, как ука-



Структурная формула VMA-13-15

Structural formula VMA-13-15

зано выше, используя в качестве растворителя воду очищенную. 2 мл раствора А или 3 мл раствора Б помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят водой очищенной до метки. Оптическую плотность полученных растворов измеряют при длинах волн 266 и 226 нм соответственно. Параллельно измеряют оптическую плотность растворов стандартного образца БАС.

Приготовление раствора стандартного: около 0,05 г (точная навеска) СО БАС помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляют 30 мл воды очищенной, взбалтывают до полного растворения и доводят этим же растворителем до метки (раствор В). Далее готовят разведения согласно методике количественного определения субстанции, описанной выше.

Расчет содержания БАС в анализируемых образцах проводили с учетом оптической плотности стандартного образца

$$x \% = \frac{A_x \cdot C \cdot 50 \cdot 100 \cdot 100}{A_{\text{ст}} \cdot V \cdot a(100 - W)}$$

Для построения градуировочных графиков готовили серию растворов, используя исходные растворы А или Б. С этой целью 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 мл этих растворов переносили в мерные колбы вместимостью 100 мл и доводили до метки соответствующим растворителем.

Валидационную характеристику «линейность» проверяли экспериментально измерением аналитического сигнала для проб с различным содержанием исследуемой субстанции в пределах аналитической области методики — от 70 до 130 % номинального содержания [2].

Проверку прецизионности (на уровне схожести) проводили по 6 параллельным определениям и рассчитывали величины стандартного отклонения (RS) и относительного стандартного отклонения (RSD) (см. табл. 2).

При исследовании внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности анализ проводили два сотрудника в разные дни. Межлабораторную прецизионность подтверждали путем проведения измерений на трех разных приборах на одной серии БАС.

## Результаты исследования и их обсуждение

Электронные спектры поглощения водных растворов органических веществ, имеющие заместители как кислотного, так и основного характера, могут иметь различный характер в зависимости от значений рН используемого раствора. На смещение спектров поглощения, а также интенсивность поглощения, большое влияние может оказывать содержание ионной или молекулярной формы исследуемого вещества. Известно, что влияние рН раствора практически исключается в том случае, если значение  $pH = pK \pm 3$ , поскольку в данных условиях исследуемое вещество находится на 99,9 % в одной из своих форм.

Константы ионизации определяли с помощью электронного ресурса [chemicalize.com](http://chemicalize.com), при этом оказалось, что вещество имеет константу как кислота ( $pK_1 = 11,3$ ) и две константы как основание ( $pK_2 = 4,71$  и  $pK_3 = 8,77$ ).

Полученные значения рК позволили рассчитывать количества молекулярной и ионизированной формы субстанции (%) в зависимости от рН среды водного раствора.

Значения рК = 4,71 и рК = 8,77 свидетельствуют, что молекула БАС в растворе может проявлять основные свойства и быть полностью ионизированной как основание только при  $pH \leq 1,7$ . Так как водные растворы субстанции, приготовленные для измерения оптической плотности, имеют значения рН в области 5,5–5,7, можно считать, что в растворе содержится смесь молекулярной и ионизированной форм БАС как основания, так и молекулярной формы как кислоты ( $pK = 11,77$ ) [1].

В полностью ионизированной форме как кислоты БАС находится в растворах при рН более 14. При рН более 12 (0,1 М раствор гидроксида натрия) можно считать, что иони-

зированная форма в растворе содержится на 99 % ( $pH = pK \pm 2$ ).

Таким образом, для анализа нами были использованы вода очищенная, а также щелочные и кислые растворы.

Как следует из табл. 1, спектры поглощения БАС как в воде, так и в растворе 0,1 М гидроксида натрия имеют три максимума поглощения при 226,266 и 302 нм. Однако при использовании щелочного раствора значительно увеличивается интенсивность поглощения по сравнению с поглощением водных растворов. В кислом растворе спектр поглощения имел только два максимума.

Полоса поглощения в области 225–230 нм обусловлена  $\pi \rightarrow \pi^*$  переходом в насыщенных связях хиназолинового кольца. Характер поглощения в длинноволновой части спектра, вероятно, обусловлен электронными переходами, включающими всю сопряженную систему хиназолинового кольца и пропионилгуанидиновой группы как акцептора электронов.

В соответствии с требованиями Общей фармакопейной статьи ГФ XIII «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях», выбор концентрации измеряемого раствора при разработке методики количественного определения проводится с учетом минимальной систематической ошибки, которая получается при значении оптической плотности 0,4343. Поэтому подбор концентраций для построения градуировочного графика и расчет навески проводили исходя из данного значения [2].

При изучении влияния растворителя на точность результатов спектрофотометрического анализа измеряли оптическую плотность растворов, приготовленных для построения градуировочных графиков в максимумах поглощения как в коротковолновой (225–230 нм), так и в длинноволновой области (265–270 нм).

Таблица 1 / Table 1

Спектрофотометрические характеристики *N*-(2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил)гуанидина (VMA-13-15)  
Spectrophotometric characteristics of *N*-(2-[4-oxo-3(4*H*)-quinazoliny]propionyl)guanidine (VMA-13-15)

Растворитель	Длина волны, нм	Уравнение регрессии	R	Аналитическая область, С%	$E^{1\%}_{1\text{ см}}$	$\epsilon E^{1\%}_{1\text{ см}}$
Вода	226	$y = 1028x + 0,007$	0,9992	0,0002–0,0008	1050	1,61
	266	$y = 228,1x - 0,022$	0,9979	0,001–0,004	218	1,34
	302	$y = 124,7x - 0,038$	0,9993	0,003–0,006	116	1,21
0,1 М раствор натрия гидроксида	226	$y = 1135x - 0,058$	0,9988	0,0003–0,0009	1025	2,20
	266	$y = 225,5x - 0,010$	0,9973	0,001–0,004	221	1,46
	302	$y = 137,7x - 0,075$	0,9994	0,003–0,006	120	2,13
0,1 М раствор кислоты хлористоводородной	227	$y = 903,9x - 0,046$	0,9954	0,0003–0,0009	819	2,25
	273	$y = 214,5x - 0,020$	0,9986	0,001–0,004	205	1,34

Таблица 2 / Table 2

Результаты количественного определения *N*-(2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил)гуанидина (VMA-13-15)  
Results of quantitative determination of *N*-(2-[4-oxo-3(4*H*)-quinazolinyl]propionyl)guanidine (VMA-13-15)

№	1-я серия			2-я серия			3-я серия		
	Навеска	$A_x$	Найдено	Навеска	$A_x$	Найдено	Навеска	$A_x$	Найдено
1	0,0550	0,426	99,88	0,0560	0,425	99,64	0,0499	0,422	98,94
2	0,0501	0,423	99,17	0,0481	0,421	98,70	0,0520	0,431	101,05
3	0,0490	0,429	100,58	0,0552	0,427	100,11	0,0502	0,428	100,35
4	0,0511	0,431	101,52	0,0571	0,432	101,28	0,0565	0,423	99,17
5	0,0523	0,422	98,94	0,0510	0,422	98,94	0,0513	0,437	102,4
6	0,0552	0,436	102,52	0,0501	0,435	101,99	0,0563	0,426	99,88

*Метрологические характеристики*1-я серия:  $x_{cp} = 100,43 \%$ ,  $SD = 1,30$ ,  $RSD = \pm 1,30 \%$ 2-я серия:  $x_{cp} = 100,11 \%$ ,  $SD = 1,29$ ,  $RSD = \pm 1,29 \%$ 3-я серия:  $x_{cp} = 100,29 \%$ ,  $SD = 1,28$ ,  $RSD = \pm 1,28 \%$ 

№	Внутрилабораторная прецизионность					
	Исследователь 1			Исследователь 2		
	Навеска	$A_x$	Найдено	Навеска	$A_x$	Найдено
1	0,0550	0,426	99,88	0,0515	0,431	101,35
2	0,0501	0,423	99,17	0,0489	0,429	100,58
3	0,0490	0,429	100,58	0,0553	0,423	99,17
4	0,0511	0,431	101,52	0,0507	0,427	100,11
5	0,0523	0,422	98,94	0,0499	0,425	99,64
6	0,0552	0,436	102,52	0,0541	0,438	102,56

*Метрологические характеристики*Исследователь 1:  $x_{cp} = 100,43 \%$ ,  $SD = 1,3$ ,  $RSD = \pm 1,3 \%$ Исследователь 2:  $x_{cp} = 100,56 \%$ ,  $SD = 1,18$ ,  $RSD = \pm 1,18 \%$ 

№	Межлабораторная прецизионность								
	Спектрофотометр 1			Спектрофотометр 2			Спектрофотометр 3		
	Навеска	$A_x$	Найдено	Навеска	$A_x$	Найдено	Навеска	$A_x$	Найдено
1	0,0560	0,425	99,64	0,0550	0,427	100,1	0,0567	0,426	99,88
2	0,0481	0,421	98,70	0,0501	0,431	101,05	0,0511	0,423	99,17
3	0,0552	0,427	100,11	0,0490	0,426	99,88	0,0545	0,425	99,64
4	0,0571	0,432	101,28	0,0511	0,432	101,28	0,0499	0,424	99,41
5	0,0510	0,422	98,94	0,0523	0,439	102,78	0,0503	0,422	98,94
6	0,0501	0,435	101,99	0,0554	0,428	100,35	0,0506	0,435	101,99

*Метрологические характеристики*Спектрофотометр 1:  $x_{cp} = 100,11 \%$ ,  $SD = 1,29$ ,  $RSD = \pm 1,29 \%$ Спектрофотометр 2:  $x_{cp} = 100,90 \%$ ,  $SD = 1,06$ ,  $RSD = \pm 1,06 \%$ Спектрофотометр 3:  $x_{cp} = 99,83 \%$ ,  $SD = 1,10$ ,  $RSD = \pm 1,10 \%$ 

Были установлены границы концентраций, в которых соблюдается основной закон светопоглощения, рассчитаны уравнения регрессии градуировочных графиков, коэффициенты корреляции и значения удельных показателей

поглощения в максимумах поглощения в различных растворителях (табл. 1).

Как следует из табл. 1, аналитическая область во всех растворителях при длине волны 226–227 нм находится в границах от

0,0002–0,0009 % вещества в пробе, при длине волны 266 и 273 нм — от 0,001–0,004 % и для 302 нм — 0,002–0,008 %. При этом уравнения градуировочных графиков имеют незначительную величину свободного члена, то есть прямые градуировочных графиков проходят через начало координат. Коэффициент корреляции ( $r$ ) находится в пределах 0,9942–0,9999, следовательно, не превышает значения  $r \leq 0,999$ , установленные ГФ, то есть результаты оценки линейности свидетельствуют о пригодности выбранной методики количественного определения БАС в исследованном диапазоне концентраций.

Специфичность методики подтверждали соответствием положениям максимумов исследуемого БАС и СО.

Выбор оптимальной длины волны производили на основании ошибки расчета удельного показателя для каждой длины волны и соответствующего растворителя. При использовании воды очищенной ошибка не превышает 1,6 % при всех аналитических длинах волн. В растворе щелочи минимальная ошибка наблюдалась при 266 нм — 1,46 %, а при 226 и 302 нм — 2,2 %. Для раствора кислоты минимальная ошибка наблюдалась в коротковолновой области — 1,34 %.

В табл. 2 приведены данные, позволяющие предложить для разрабатываемой методики получения растворов использовать воду и измерять оптическую плотность при 266 нм.

Важным этапом оценки аналитической методики служит подтверждение ее валидности, по следующим валидационным характеристикам: специфичность, линейность, прецизионность и правильность.

В приемлемых условиях по методике, приведенной выше, были проанализированы три образца БАС. Как следует из табл. 2, содержание БАС в исследуемых образцах находится в пределах 98–102 % и относительная погрешность измерения составляет 1,29 %, то есть методика прецизионна по сходимости результатов и приемлема для анализа исследуемого соединения [5].

При сравнении результатов, полученных двумя сотрудниками (внутрилабораторная прецизионность), следует, что различия между их результатами незначительны (табл. 2). При проведении межлабораторной прецизионности значения RSD составили 1,29, 1,06 и 1,10 % соответственно. Это показывает, что различия между результатами также незначительны. Полученные результаты определения прецизионности по трем вариантам свидетельствуют о валидности методики по показателю прецизионности.

Правильность методики подтверждали анализом на трех уровнях анализируемых концентраций соответствующих 80, 100, 120 % номинального содержания. На каждом уровне проводили по три определения. Как известно, приемлемыми критериями правильности спектрофотометрической методики определения субстанции являются результаты открываемости на уровне 98–102 % и отсутствие значимой систематической ошибки. Полученные результаты свидетельствуют, что значения открываемости  $\bar{R}$ , равные 100,11, находятся в пределах 98–102 % при значении RDS равном 1,3 %, что является признаком валидности по данному показателю [5].

## Заключение

С использованием полученных расчетным путем значений констант ионизации обоснован выбор растворителя и разработана спектрофотометрическая методика количественного определения БАС *N*-(2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил)гуанидина. Показано, что предложенная методика специфична, линейна в области аналитических концентраций, а также прецизионна и правильна, что подтверждает возможность ее использования для количественного определения.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

## Литература

1. Альберт А., Сержент Е. Константы ионизации кислот и оснований / Пер. с англ. Е.Ю. Беляева, В.И. Зайонца, И.Я. Квитко, Б.В. Пассета, под ред. Б.А. Порай-Кошица. – Москва, Ленинград: Химия, 1964. – 380 с. [Albert A, Sergeant E. Konstanty ionizatsii kislot i osnovaniy. Transl. from Engl. E.Yu. Belyaev, V.I. Zajonts, I.Ya. Kvitko, B.V. Passet, ed. by B.A. Poray-Koshits. Moscow, Leningrad: Khimiya; 1964. 380 p. (In Russ.)]
2. Федеральная электронная медицинская библиотека. Государственная фармакопея РФ. XIV издание. Т. IV. – М., 2018. – 1832 с. [Federal electronic medical library. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV edition. Vol. IV. Moscow; 2018. 1832 p. (In Russ.)]. Доступно по: <http://www.femb.ru/femb/pharmacopoea.php>. Ссылка активна на 09.09.2019.
3. Патент РФ на изобретение RU № 2622638 С1. Петров В.И., Тюренков И.Н., Озеров А.А., и др. Производные хиназолин-4(3*H*)-она, обладающие нейро- и кардиопротекторной активностью. [Patent RUS No. 2622638 C1. Petrov VI, Tyurenkov IN, Ozerov AA, et al. Proizvodnye khinazolin-4(3H)-ona, obladayushchie neuro- i kardioprotekturnoy aktivnost'yu.

- (In Russ.)]. Доступно по: [https://yandex.ru/patents/doc/RU2622638C1\\_20170619](https://yandex.ru/patents/doc/RU2622638C1_20170619). Ссылка активна на 14.09.2019.
4. Шпрах З.С., Игнатъева Е.В., Ярцева И.В., и др. Разработка и валидация методики количественного определения цифетрилина в таблетках // Российский биотерапевтический журнал. – 2016. – Т. 15. – № 3. – С. 55–61. [Shprakh ZS, Ignat'yeva YeV, Yartseva IV, et al. Development and validation of cyphetrylin assay in tablets. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal*. 2016;15(3):55-61. (In Russ.)]
  5. Ravichandran V, Shalini S, Sundram KM, Harish R. Validation of analytical methods strategies and importance. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2010;2:18-22.

#### ▪ Информация об авторах

*Евгения Владимировна Компанцева* — доктор фармацевтических наук, профессор, профессор кафедры фармацевтической и токсикологической химии, Пятигорский медико-фармацевтический институт — филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, Пятигорск. E-mail: [pharmachemistry@mail.ru](mailto:pharmachemistry@mail.ru).

*Дарья Николаевна Луценко* — аспирант кафедры фармацевтической и токсикологической химии, Пятигорский медико-фармацевтический институт — филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, Пятигорск. E-mail: [Lucenkodasha95@mail.ru](mailto:Lucenkodasha95@mail.ru).

*Александр Алексеевич Глушко* — кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры неорганической, физической и коллоидной химии, Пятигорский медико-фармацевтический институт — филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, Пятигорск. E-mail: [pharmachemistry@mail.ru](mailto:pharmachemistry@mail.ru).

#### ▪ Information about the authors

*Evgenia V. Kompantseva* — Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor, Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, a Branch of Volgograd State Medical University, Pyatigorsk. E-mail: [pharmachemistry@mail.ru](mailto:pharmachemistry@mail.ru).

*Daria N. Lutsenko* — Postgraduate student, Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, a Branch of Volgograd State Medical University, Pyatigorsk. E-mail: [Lucenkodasha95@mail.ru](mailto:Lucenkodasha95@mail.ru).

*Alexander A. Glushko* — Candidate of Pharmaceutical Sciences, Senior Lecturer, Department of Inorganic, Physical, and Dispersoidology, Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, a Branch of Volgograd State Medical University, Pyatigorsk. E-mail: [pharmachemistry@mail.ru](mailto:pharmachemistry@mail.ru).