

Разработка методики определения количественного содержания новой субстанции, производной хиназолин-4(3н)-она, методом УФ-спектрофотометрии

Е. С. Мищенко^{1*}, А. Д. Лазарян¹, Т. Т. Лихота¹

¹ – Пятигорский медико-фармацевтический институт, филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России (ПМФИ, филиал ФГБОУ ВО «ВолГМУ» Минздрава России), 357532, Россия, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, д. 11

*Контактное лицо: Мищенко Екатерина Сергеевна. E-mail: ekaterina-mishchenko1809@mail.ru

Статья получена: 07.11.2019. Статья принята к печати: 11.12.2019

Резюме

Введение. Исследуемая субстанция является эффективным средством, которое сочетает в себе несколько фармакологических эффектов, а именно: антидепрессивный, анксиолитический и ноотропный. В результате доклинических испытаний, исследуемое соединение показало себя как эффективное средство в борьбе и профилактике острых нарушений мозгового кровообращения (ОНМК). Свои фармакологические эффекты субстанция реализует за счет стимулирования выработки оксида азота эндотелиальными клетками головного мозга, вследствие чего происходит вазодилатация сосудов и улучшение кровотока в ишемизированной части сосудов. Следовательно, для внедрения в медицинскую практику исследуемой биологически активной субстанции, необходимо разработка способов контроля качества как изучаемой субстанции, так и перспективных ее препаратов.

Цель. Целью настоящего исследования явилась разработка методики количественного определения биологически активной субстанции, производной хиназолин-4(3Н)-она (лабораторный шифр – VMA-10-18), методом УФ-спектрофотометрии с последующей ее валидацией.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали предварительно очищенную от исходных и промежуточных продуктов синтеза субстанцию VMA-10-18. Данная субстанция представляет собой белый кристаллический порошок, без запаха, гигроскопичный. Предварительные исследования физико-химических свойств, позволили нам использовать в качестве растворителя спирт этиловый 95 %.

Результаты и обсуждение. Определено количественное содержание действующего вещества в субстанции, производной хиназолин-4(3Н)-она. Проведен расчет удельного показателя поглощения, с последующей статистической обработкой результатов. Валидационная оценка проведена по показателям «Специфичность», «Линейность», «Правильность», «Повторяемость». Полученные статистические данные свидетельствуют об эффективности разработанной методики и ее экспериментальной воспроизводимости.

Заключение. В результате проведенного исследования, нами разработана методика количественного определения изучаемого соединения, которое может быть предложено для включения в нормативно-техническую документацию на субстанцию VMA-10-18. Установлено количественное содержание действующего вещества в исследуемой субстанции, рассчитан показатель удельного поглощения. Все данные статистически обработаны и соответствуют предъявляемым требованиям нормативной документации.

Ключевые слова: хиназолин-4(3Н)-он, субстанция VMA-10-18, УФ-спектрофотометрия, валидация, острые нарушения мозгового кровообращения.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Е. С. Мищенко и Т. Т. Лихота проводила количественный анализ исследуемой субстанции. А. Д. Лазарян и Т. Т. Лихота проводили статистическую обработку и интерпретацию результатов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Мищенко Е. С., Лазарян А. Д., Лихота Т. Т. Разработка методики определения количественного содержания новой субстанции, производной хиназолин-4(3Н)-она, методом УФ-спектрофотометрии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(1): 30–34.

Development of UV-spectrophotometry Method of the Quantitative Determination of a New Substance Quinazoline-4(3h)-on Derivate

Ekaterina S. Mishchenko^{1*}, Anush D. Lazaryan¹, Tat'yana T. Lihota¹

¹ – Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute of Volgograd Medical State University of the Ministry of Health Care of Russia, 11, Kalinina av., Pyatigorsk, Stavropol region, 357532, Russia

*Corresponding author: Ekaterina S. Mishchenko. E-mail: ekaterina-mishchenko1809@mail.ru

Received: 07.11.2019. Accepted: 11.12.2019

Abstract

Introduction. The aim idea of this research article is a development of the quantitative determination of a biologically active substance quinazolin-4(3H)-on derivate with laboratory cypher «VMA-10-182, by UV-spectrophotometry with followed validation. The substance is an effective remedy that combines several pharmacological effects, like an antidepressant, anxiolytic and nootropic. As a result of preclinical trials, the research compound has proven to be an effective remedy in the fight and prevention of acute cerebrovascular accident (stroke). The substance realized pharmacological effects by stimulating the production of nitric oxide by the endothelial cells of the brain. As a result of stimulating is a vasodilation of the vessels and improvement of blood flow in the ischemic part of the vessels occur. Therefore, for introducing the biologically active substance into medical practice we need to develop ways to control the quality of substance.

Aim. The objective of this research work is to develop a method of the quantitative determination of a biologically active substance, derivative quinazolin-4(3H)-on (laboratory sypher – VMA-10-18), by method of UV spectrophotometry. The results of the research work were validated.

Materials and methods. In this research we used a substance VMA-10-18 which was previously purified from the initial and intermediate products of the synthesis. This substance is a white crystalline powder, odorless, hygroscopic.

Results and discussion. The quantitative content of the active substance derived quinazolin-4(3H)-on has been determined. The specific absorption rate was calculated, followed by statistical processing of the results. The validation was carried out according to the «Specificity», «Linearity», «Accuracy», «Repeatability». The results indicate the effectiveness of the developed methodology and experimental reproducibility.

Conclusion. Researches of physicochemical properties show al us use 95 % ethanol as a solvent. As a result we developed a method for the quantitative determination of the substance which can be proposed for inclusion in the normative documents. The quantitative determination of the active substance in the test substance was established, and the specific absorption index was calculated. All information are statistically processed and meet the requirements of regulatory documentation.

Keywords: quinazolin-4(3H)-on, substance VMA-10-18, UV-spectrophotometry, validation, acute cerebrovascular accident.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Ekaterina S. Mishchenko and Tat'yana T. Lihota conducted a quantitative analysis of the investigated substance. Anush D. Lazaryan and Tat'yana T. Lihota conducted statistical processing and interpretation of the results. All authors participated in the discussion of the results and the writing of the text of the article.

For citation: Mishchenko E. S., Lazaryan A. D., Lihota T. T. Development of UV-spectrophotometry method of the quantitative determination of a new substance quinazoline-4(3h)-on derivate. *Drug development & registration*. 2020; 9(1): 30–34.

ВВЕДЕНИЕ

По данным ВОЗ от сосудистых заболеваний сердца и головного мозга в мире ежегодно умирают около 17,5 млн человек (что составляет 30 % смертности от всех заболеваний) [1–3].

Новая субстанция, синтезированная на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Волгоградского Государственного Медицинского университета, проявляет целый комплекс свойств, способных бороться с ОНМК. Исследуемое соединение является производным хиназолин-4(3H)-она. Лабораторным шифр «VMA-10-18». Химическая формула: 3-[2-(4-метоксифениламино)-2оксоэтил]-хиназолин-4(3H)-она [4–6].

В результате доклинических испытаний у субстанции выявлены свойства, позволяющие рекомендовать её как эффективное антидепрессивное, антигипоксическое и улучшающее мозговое кровообращение средство. Данные виды фармакологической активности объясняются стимулирующим действием субстанции на высвобождение оксида азота эндотелиальными клетками, что влечет за собой улучшение коллатерального кровотока в ишемизированной части сосуда [7].

По своим фармакологическим эффектам, исследуемую субстанцию можно приблизить к таким сосудистым препаратам, как пикамилон и кавинтон.

Пикамилон представляет собой производное гамма-аминомасляной кислоты, оказывающий прямое миорелаксирующее действие на стенку сосудов и улучшающей фармакокинетические свойства ГАМК [8–9].

Кавинтон является препаратом алкалоида винкамина. Данный препарат избирательно улучшает кровоснабжение спазмированных сосудов головного мозга, предотвращает феномен «обкрадывания» [9–10].

Помимо вышеуказанных фармакологических эффектов, исследуемая субстанция обладает метаболическими свойствами и приравнивается к таким препаратам, как мексидол и фенибут.

Мексидол является ингибитором свободнорадикального окисления липидов биомембран, повышает активность антиоксидантных ферментов [11].

Фенибут проявляет себя как ГАМК-эргическое средство, способствующее проведению нервных импульсов в ЦНС. Препарат сочетает в себе метаболические свойства, транквилизирующее, психостимулирующее, антиагрегантное и антиоксидантное действие [12–13].

В связи с этим актуальна разработка методик контроля качества новой эффективной субстанции с доказанными доклиническими, клиническими эффектами с помощью современных методов физико-химического анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования нами использована предварительно очищенная и дважды перекристаллизованная в уксусной кислоте, субстанция VMA-10-18.

В работе использовали прибор СФ-56 (ООО «ОКБ СПЕКТР», Россия) с соответствующим программным обеспечением, весы аналитические ВЛ-124, мерная посуда 1-го класса точности. В качестве растворителя использовали спирт этиловый 96 %, исходя из растворимости субстанции [5].

Методика количественного определения

Около 0,05 г (точная навеска) субстанции помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл спирта этилового 96 %, перемешивали, тем же растворителем доводили до метки и снова перемешивали. Затем 1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили до метки спиртом этиловым 96 %.

Оптическую плотность полученного раствора измеряли на спектрофотометре при длине волны 230 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали спирт этиловый 96 %.

Содержание действующего вещества в субстанции вычисляли по формуле:

$$X, \% = \frac{A \cdot 100 \cdot 100}{A_{\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;
 a – навеска исследуемой субстанции (г); $A_{\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения субстанции VMA-10-18 при длине волны 230 нм.

Валидацию разработанной методики проводили по показателям «Специфичность», «Линейность», «Аналитическая область методики», «Прецизионность», «Правильность» [14, 16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

УФ-спектр исследуемого соединения, представленный на рисунке 1, в области от 220 до 380 нм имеет две полосы поглощения, при длине волны 230 и 255 нм.

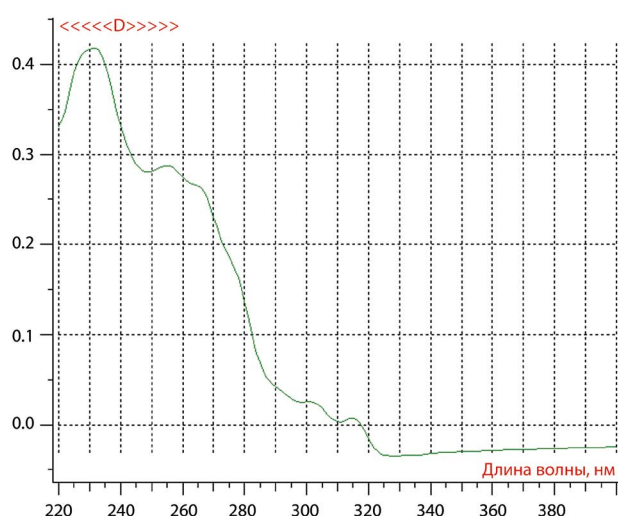


Рисунок 1. УФ-спектр исследуемого соединения VMA-10-18

Figure 1. UV-spectra of substance VMA-10-18

Для определения количественного содержания, приемлемой является длина волны 230 нм, так как она находится в оптимальной области поглощения и является более пологой по сравнению с другим максимумом [15].

Удельный показатель поглощения ($A_{\text{см}}^{1\%}$) раствора 0,0005 % субстанции определяли в пределах концентраций, которые подчиняются закону Бугера – Ламберта – Бера. Полученные результаты были валидированы и представлены в таблице 1.

Данные таблицы говорят об отсутствии систематической ошибки и позволяют использовать данный показатель в расчётах количественного содержания субстанции.

Специфичность методики определяли с помощью анализа модельной смеси (раствора субстанции в спирте этиловом 96 %), анализа образцов после воздействия экстремальных условий. Установлено, что при воздействии на исследуемый образец света, температуры, влажности оптические показатели анали-

зируемого раствора не менялись. При проведении щелочного гидролиза субстанции, оптические показатели раствора также оставались неизменными [16].

Таблица 1. Статистическая обработка результатов определения удельного показателя поглощения исследуемого раствора субстанции VMA-10-18

Table 1. The results of statistical processing specific absorption rate of solution of substance VMA-10-18

№ п/п	Навеска, г	Оптическая плотность, A	Удельный показатель поглощения,	$\bar{X} - X_i$	$(\bar{X} - X_i)^2$
1	0,0506	0,5017	991,5	-5,12	26,1803
2	0,0515	0,5134	996,9	-10,52	110,6003
3	0,0514	0,5087	987,8	-1,42	2,0069
4	0,0506	0,5085	989,3	-2,92	8,5069
5	0,0512	0,4939	964,6	21,78	474,5136
6	0,0508	0,5020	988,2	-1,82	3,3003
					$\Sigma = 625,1083$
Метрологические характеристики					
Среднее значение $\bar{X}$					986,38
Дисперсия (S^2)					125,02
Стандартное отклонение (S)					11,18
Доверительный интервал (Δx)					11,73
Относительная погрешность (ϵ , %)					1,19
Критерий Стьюдента (t)					$1,19 < 2,57(0,95;5)$

Для определения линейности методики использовали диапазонконцентрации от 80 до 120 % [14, 16]. Полученные данные представлены на рисунке 2.

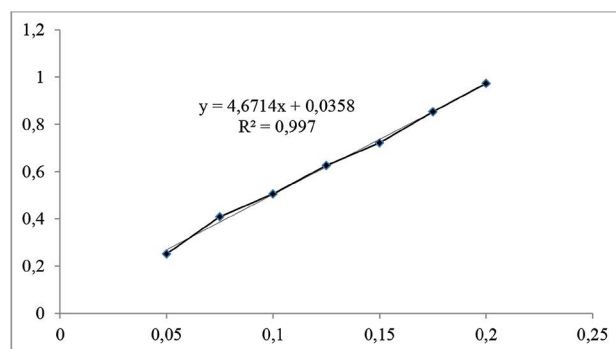


Рисунок 2. График линейной зависимости оптической плотности раствора от содержания субстанции VMA-10-18

Figure 2. Graph of linear dependence of the optical density of the solution on the content of the substance VMA-10-18

Аналитическая область методики находится в диапазоне концентраций от $0,05 - 0,25 \cdot 10^{-3}$ мг/мл. Коэффициент корреляции составил 0,997, что соответствует требованиям ГФ XIV издания [14, 16], что подтверждает наличие жесткой линейности графика.

Повторяемость (сходимость) результатов проверяли путем расчёта количественного содержания в 6 повторностях. Полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты оценки повторяемости методики количественного определения VMA-10-18

Table 2. The results of determining the precision of the method of quantitative determination VMA-10-18

№ п/п	Навеска, г	Оптическая плотность, А	Найдено, %	$\bar{X} - X_i$	$(\bar{X} - X_i)^2$
1	0,0506	0,5017	99,0	1,08	1,2544
2	0,0515	0,5134	98,3	1,78	3,3124
3	0,0514	0,5087	99,9	0,18	0,0484
4	0,0506	0,5085	101,8	-1,72	2,8224
5	0,0512	0,4939	101,6	-1,52	2,1904
6	0,0508	0,5020	99,9	0,18	0,0336
					$\Sigma = 9,6683$
Метрологические характеристики				$X_{cp} = 100,08$ $SD = 1,55$ $RSD = 1,54\%$	

Стандартное отклонение и относительное стандартное отклонение методики являются приемлемыми для данного показателя и не превышают 2 % [14, 16].

Правильность методики устанавливали на трех уровнях концентрации в 3 повторностях. Полученные результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3. Результаты оценки правильности методики определения количественного содержания субстанции VMA-10-18

Table 3. The results of determining the correctness of the method of quantitative determination of the substance VMA-10-18

№ п/п	Навеска, г	Оптическая плотность, А	Найдено, %	$\bar{X} - X_i$	$(\bar{X} - X_i)^2$
1	0,0374	0,3980	100,3	-0,69	0,4746
2	0,0377	0,3924	99,5	0,11	0,0123
3	0,0373	0,3805	100,5	-0,89	0,7901
4	0,0510	0,4849	98,0	1,61	2,5957
5	0,0507	0,4767	98,6	1,01	1,0223
6	0,0503	0,4939	99,4	0,21	0,0446
7	0,0624	0,6967	100,2	-0,59	0,3468
8	0,0624	0,6820	100,2	-0,59	0,3468
9	0,0626	0,6971	99,8	-0,19	0,0357
					$\Sigma = 5,6689$
Метрологические характеристики				$X_{cp} = 99,611$ $SD = 0,84$ $RSD = 0,845 \%$	

Стандартное отклонение и относительное стандартное отклонение методики являются приемлемыми для данного показателя и говорят о том, что методика свободна от систематической ошибки [14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Произведен выбор оптимальных условий на основе которых разработана методика количественного определения. Установлено, что содержание действующего вещества составляет не менее 98 % и не более 100 %.
2. Разработанная методика валидирована по показателям, рекомендованных Государственной Фармакопеей РФ XIV издания и другой нормативно документацией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Янишевский С. Н. Лечение пациентов с сосудистой патологией головного мозга: некоторые решения сложной задачи. *Справочник поликлинического врача*. 2017; 6: 52–56.
2. Барышников Г. А. Профилактика инсульта. *Справочник поликлинического врача*. 2009; 10: 68–74.
3. Скворцова В. И., Шетова И. М., Какорина Е. П., Камкин Е. Г., Бойко Е. Л., Алякин Б. Г., Иванова Г. Е., Шамалов Н. А., Дашьян В. Г., Крылов В. В. Снижение смертности от острых нарушений мозгового кровообращения в результате реализации комплекса мероприятий по совершенствованию медицинской помощи пациентам с сосудистыми заболеваниями в Российской Федерации. *Профилактическая медицина*. 2018; 21(1): 4–10. DOI: 10.17116/profmed20182114-10.
4. Tiwary B. K., Pradhan K., Nandaand A. K., Chakraborty R. Implication of Quinazoline-4(3H)-ones in Medicinal Chemistry: A Brief Review. *JChemBioTher*. 2015; 1(1): 104.
5. Мищенко Е. С., Лазарян Д. С. Разработка методик анализа биологически активного соединения группы хиназолин-4(3H)-она: Беликовские чтения. Материалы VI Всероссийской научно-практической конференции; 07–08 декабря 2017 г; Пятигорский медико-фармацевтический институт, филиал Волгоградского государственного медицинского университета Минздрава России, Пятигорск. *Из-во: Рекламно-информационное агентство на Кавминводах*. 2018; 6: 39–44.
6. Петров В. И., Тюренков И. Н., Озеров А. А. 2014. Производные хиназолина, обладающие антидепрессивной, анксиолитической и ноотропной активностью. Пат. 2507199 Рос. Федерация. № 2012138666/04. Бюл. № 5.
7. Киселева А. В., Чурляев Ю. А., Григорьев Е. В. Роль оксида азота в повреждении нейронов при критических состояниях. *Общая реаниматология*. 2009; 5(5): 80.
8. Закусов В. В., Каверина Н. В., Бендикова Э. А., Буров Ю. В., Мирзоян Р. С., Ганьшина Т. С., Сперанская Н. П., Курочкин И. Г., Жуков В. Н., Салимов Р. М., Борисенко С. А., Цикалова Т. С., Копелевич В. М., Буланова Л. Н., Гунар В. И. 1977. Вазоактивное и ноотропное средство пикамилон. Патент России № 1393428. Бюл. № 17.
9. Ласков В. Б., Поветкин С. В., Чернышков Е. В. Влияние кавинтона форте и пикамилон на когнитивные расстройства у больных дисциркуляторной энцефалопатией. *Клиническая геронтология*. 2009; 15(10-11): 17–21.
10. Avula B., Chittiboyina A. G., Sagi S. R., Wang Y.-H., Wang M., Khan I. A., Cohen P. A. Identification and quantification of vinpocetine and picamilon in dietary supplements sold in the United States. *Drug Test. Analysis*. 2016; 8(3-4): 334–343. DOI: 10.1002/dta.1853.
11. Воронина Т. А. Антиоксидант мексидол. Основные нейротропные эффекты и механизм действия. *Психофармакология и биологическая наркология*. 2001; 1(1): 2–12.
12. Гитлин И. Г., Дорожко А. И., Иоффе Н. Т., Серебряный В. А., Фокин С. И., Шерешевский А. А. 2010. Способ получения N-никотиноил-γ-аминомасляной кислоты. Патент РФ 2008111785/04; 2008.03.28.
13. Сучков Е. А., Смирнова Л. А., Рябуха А. Ф., Перфилова В. Н. Особенности фармакокинетики производных ГАМК. *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. 2012; 41: 172–173.
14. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. Т. 1. М.: ФЭМБ. 2018: 1814.

15. Булатов М. И., Калинин И. П. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа. 5-е изд. – Л.: Химия. 1986: 432.
16. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [cited 2019 Dec 05]. Available at: https://database.ich.org/sites/default/files/q2_r1___guideline.pdf
7. Kiseleva A. V., Churlyayev Y. A., Grigoryev Y. V. Role of Nitric Oxide in Neuronal Damages in Critical Conditions. *General Reanimatology*. 2009; 5(5): 80 (In Russ.).
8. Zakusov V. V., Kaverina N. V., Bendikov E. A., Burov Yu. V., Mirzoyan R. S., Gan'shina T. S., Speranskaya N. P., Kurochkin I. G., ZHukov V. N., Salimov R. M., Borisenko S. A., Cikalova T. S., Kopelevich V. M., Bulanova L. N., Gunar V. I. 1977. Vasoactive and nootropic medicine picamilon. Russian Federation Patent No. 1393428. Bull. No. 17. (In Russ.).
9. Laskov V. B., Povetkin S. V., Chernyshkov E. V. The influence of cavinton forte and picamilon on cognitive disorders in patients with dyscirculatory encephalopathy. *Clinical gerontology*. 2009; 15(10-11): 17–21 (In Russ.).
10. Avula B., Chittiboyina A. G., Sagi S. R., Wang Y.-H., Wang M., Khan I. A., Cohen P. A. Identification and quantification of vinpocetine and picamilon in dietary supplements sold in the United States. *Drug Test. Analysis*. 2016; 8(3-4): 334–343. DOI: 10.1002/dta.1853.
11. Voronina T. A. Antioxidant Mexidol. The main neuropsychotropic effects and mechanism of action. *Psychopharmacology and biological narcology*. 2001; 1(1): 2–12. (In Russ.).
12. Gitlin I. G., Dorozhko A. I., Ioffe N. T., Serebryany V. A., Fokin S. I., Shereshevsky A. A. 2010. Process for preparation of N-nicotinoyl-γ-aminobutyric acid. RU patent 2008111785/04; 2008.03.28. (In Russ.).
13. Suchkov E. A., Smirnova L. A., Ryabukha A. F., Perfilova V. N. Pharmacokinetics of GABA derivatives. *Journal of the Volgograd State Medical University*. 2012; 41: 172–173 (In Russ.).
14. State Pharmacopeia of the Russian Federation XIV edition. 2018; 1814. (In Russ.).
15. Bulatov M. I., Kalinkin I. P. Practical Guide of photometric analysis methods. 5th ed. – L.: Chemistry. 1986: 432 (In Russ.).
16. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [cited 2019 Dec 05]. Available at: https://database.ich.org/sites/default/files/q2_r1___guideline.pdf

REFERENCES