

УДК 615.07+543.2

<https://www.doi.org/10.34907/JPQAI.2023.30.97.001>

ПОДХОДЫ К АТТЕСТАЦИИ СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА 4-((3-ОКСО-3-ЭТОКСИПРОПАНОИЛ)АМИНО)БЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ (ЭТМАБЕНА)

А.А. Адамова, студент 4-го курса ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), г. Санкт-Петербург, aleksandra.adamova@spcru.ru

П.А. Михайлова, студент 4-го курса ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), г. Санкт-Петербург, polina.mihajlova@spcru.ru

А.Б. Зеленцова, старший преподаватель кафедры аналитической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), г. Санкт-Петербург, anna.zelentsova@pharminnotech.com

Ю.Э. Генералова, старший преподаватель кафедры аналитической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), г. Санкт-Петербург, generalova.yuliya@pharminnotech.com

В статье представлен сравнительный анализ метода прямого количественного определения (титриметрии) и метода материального баланса. Последний метод является рекомендуемым методом при количественном определении стандартных образцов. Однако ввиду проведения большого количества процедур и операций метод материального баланса теоретически вносит гораздо большую погрешность, чем более простой и доступный метод прямого количественного определения. С целью их сравнения было проведено количественное определение испытуемого образца этмабена двумя способами. В качестве прямого количественного определения была выбрана алкалиметрия. Метод материального баланса включал определение содержания родственных примесей методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), остаточных органических растворителей методом газовой хроматографии (ГХ) и влаги исследованием потери массы при высушивании. В результате

исследования была рассчитана неопределенность результатов анализа и выяснен вклад в неопределенность основных источников погрешности измерения. По методу прямого количественного определения содержание стандартного образца этмабена составило 99,0%, расширенная неопределенность результата – 1,8%, по методу материального баланса – 99,2%, расширенная неопределенность результата – 3,2%. В соответствии с этими результатами неопределенность в случае метода материального баланса больше, чем в титриметрическом анализе.

Ключевые слова: этмабен, стандартный образец, количественное определение, метод материального баланса, алкалиметрия

Разработка стандартных образцов является необходимым аспектом обеспечения качества и безопасности лекарственных средств. Количественное определение основного вещества

в стандартных образцах – одно из ключевых направлений в области их аттестации. Область применения, а также основные определения регламентируются Государственной фармакопеей XIV издания [1] и ГОСТ ISO Guide 30-2019 «Стандартные образцы. Некоторые термины и определения» [2].

Государственная фармакопея XIV издания рекомендует количественное определение стандартного образца с помощью метода материального баланса, но допускает использование других подходов. Метод материального баланса является одним из наиболее точных и современных методов аттестации, но имеет и некоторые недостатки. Так, его осуществление требует проведения ряда дополнительных, часто трудоемких и дорогостоящих, процедур анализа (количественное определение всех родственных примесей, остаточных органических растворителей, влажности). В сравнении с методом материального баланса методы прямого количественного определения являются более простыми и быстрыми, с сохранением таких важных характеристик анализа, как правильность и воспроизводимость. На этот случай ГОСТ ISO Guide 35-2015 «Стандартные образцы. Общие и статистические принципы сертификации (аттестации)» [3] предполагает измерение количества основного вещества в стандартном образце следующими методами анализа: масс-спектрометрия с изотопным разбавлением, кулонометрия, гравиметрия, титриметрия и определение понижения температуры замерзания.

Наибольший интерес представляет разработка процедур аттестации, в том числе спо-

собов количественного определения, новых стандартных образцов для фармацевтических субстанций, каким является 4-((3-оксо-3-этоксипропаноил)амино)бензойная кислота (этмабен), обладающая кардиотропным действием [4].

В этой связи **целью** настоящего исследования стало сравнение метода материального баланса с методом алкалометрического титрования в количественном определении стандартного образца субстанции 4-((3-оксо-3-этоксипропаноил)амино)бензойной кислоты (этмабена).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект анализа – образец 4-((3-оксо-3-этоксипропаноил)амино)бензойной кислоты (рис. 1).

Испытуемый раствор этмабена концентрацией 0,2 мг/мл для анализа методом ВЭЖХ готовили растворением точной навески вещества массой около 10 мг в 50 мл водно-спиртовой смеси.

Анализ родственных примесей методом ВЭЖХ осуществлялся на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-10AS с УФ-детектором, снабженном колонкой Luna C18, 250×4,6 мм, 5 мкм. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила для ВЭЖХ (Ultra) Gradient HPLC или аналогичного качества с 0,1% фосфорной кислотой, в градиентном режиме от 20% до 45% ацетонитрила в течение 15 минут, скорость потока 1 мл/мин. Условия анализа: температура колонки 40°C, объем

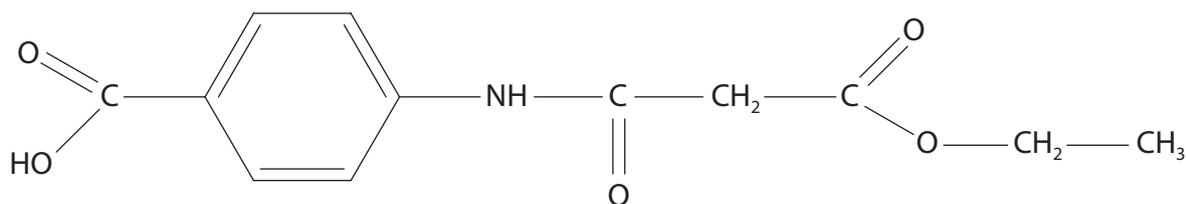
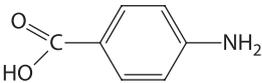
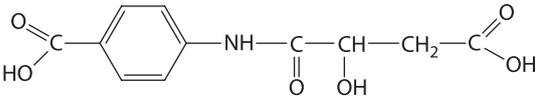
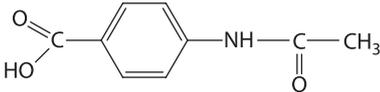
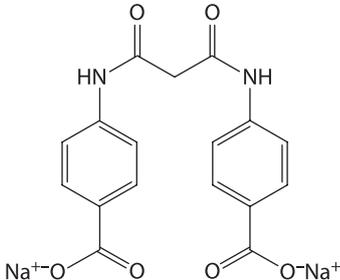


РИС. 1. Структурная формула 4-((3-оксо-3-этоксипропаноил)амино)бензойной кислоты (этмабена)

Таблица 1

РОДСТВЕННЫЕ ПРИМЕСИ ЭТМАБЕНА И МЕТОДИКА ИХ ПРИГОТОВЛЕНИЯ

| Название | Химическая формула | Приготовление |
|---|---|--|
| 4-аминобензойная кислота (примесь А) |  | Около 10 мг (точная навеска) растворили в 100 мл воды с последующим разбавлением в 200 раз с применением пипетки Мора на 5 мл, градуированной пипетки 1 мл и мерных колб 100 мл и 10 мл. |
| 4-(3-карбокси-3-оксипропионамидо)-бензойная кислота (примесь В) |  | Около 10 мг (точная навеска) растворили в 100 мл воды с последующим разбавлением в 500 раз с применением градуированных пипеток 2 мл и 1 мл и мерных колб 100 мл и 10 мл. |
| N-ацетил-4-аминобензойная кислота (примесь С) |  | Около 10 мг (точная навеска) растворили в 100 мл воды с последующим разбавлением в 500 раз с применением градуированных пипеток 2 мл и 1 мл и мерных колб 100 мл и 10 мл. |
| 4,4'-(пропандиамидо) дибензойная кислота, малабен (примесь D) |  | Около 10 мг (точная навеска) растворили в 100 мл воды с последующим разбавлением в 40 раз с применением мерных колб 10 мл и 100 мл и пипетки Мора 5 мл. |

пробы 20 мкл, УФ-детектирование проводили при длине волны 270 нм.

Ранее были установлены структуры [5] и синтезированы возможные родственные примеси в образце этмабена (табл. 1).

Определение остаточных органических растворителей проводили методом газовой хроматографии по ранее разработанной и валидированной методике на оборудовании Clarus (Perkin Elmer) с пламенно-ионизационным детектором. Для приготовления испытуемого раствора навеску этмабена 0,1002 г по-

местили во флакон для парофазного анализа и добавили 5,0 мл диметилсульфоксида. Приготовление стандартных растворов проводили следующим образом: навеску 1,3118 г стандартного образца этанола, 1,1818 г стандартного образца этилацетата поместили в мерные колбы 100 мл и довели объемы растворов диметилсульфоксидом до метки. Полученные стандартные растворы разбавили в 100 раз. Определение проводилось с использованием капиллярной колонки Rtx-1301 60 м, 0,32 мм, 1,8 мкм в условиях программирования темпе-

ратуры: 120°C в течение 4 минут с увеличением температуры до 180°C со скоростью 10°C/мин, затем 5 минут при конечной температуре, температура инжектора 120°C, температура детектора (ионизационно-пламенный) 220°C, скорость потока газа-носителя (азот) – 2 мл/мин.

Для о-ксилола была реализована альтернативная методика на газовом хроматографе «Хроматэк Кристалл 2000» с фотоионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой длиной 30 м с неполярной (полиметилсилоксановой) стационарной жидкой фазой. Условия анализа: температура колонки 100°C, температура испарителя 150°C, температура детектора 200°C, расход воздуха – 200 мл/мин, температура термостата колонок – 40°C, поток газа-носителя (азота) – 35 мл/мин, деление потока – 1/10. Объекты хроматографирования: раствор этмабена в водноспиртовой смеси с концентрацией 0,2 мг/мл, стандартный раствор о-ксилола с концентрацией 100 мг/л.

Определение потери в массе при высушивании проводили согласно ОФС.1.2.1.0010.15 [1].

Расчет количественного содержания по принципу материального баланса (метода баланса масс) проводился с применением формулы [6]:

$$w, \% = 100\% - X_{\text{орг. прим.}} - X_{\text{H}_2\text{O}} - X_{\text{р-ли}} - X_{\text{неорг. прим.}}$$

Алкалиметрия. Ввиду наличия у изучаемого объекта карбоксильной функциональной группы (рис. 1) его количественное определение также проводилось прямым кислотно-основным титрованием с использованием следующей лабораторной посуды и реактивов: бюретка 25 мл класса 2, колбы для титрования 100 мл, раствор титранта натрия гидроксида 0,02 М с $K=0,9829$, индикатор – фенолфталеин. Количественный анализ этмабена проводился методом отдельных навесок, исследуемый раствор готовили растворением навески около 0,1 г в 20 мл спирта. Точка конца титрования фиксировалась при изменении окраски индикатора с бесцветной на малиновую.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение родственных примесей методом ВЭЖХ

Исследование содержания в образце этмабена родственных примесей была проведено в условиях, описанных выше, для которых получена хроматограмма, представленная на рис. 2.

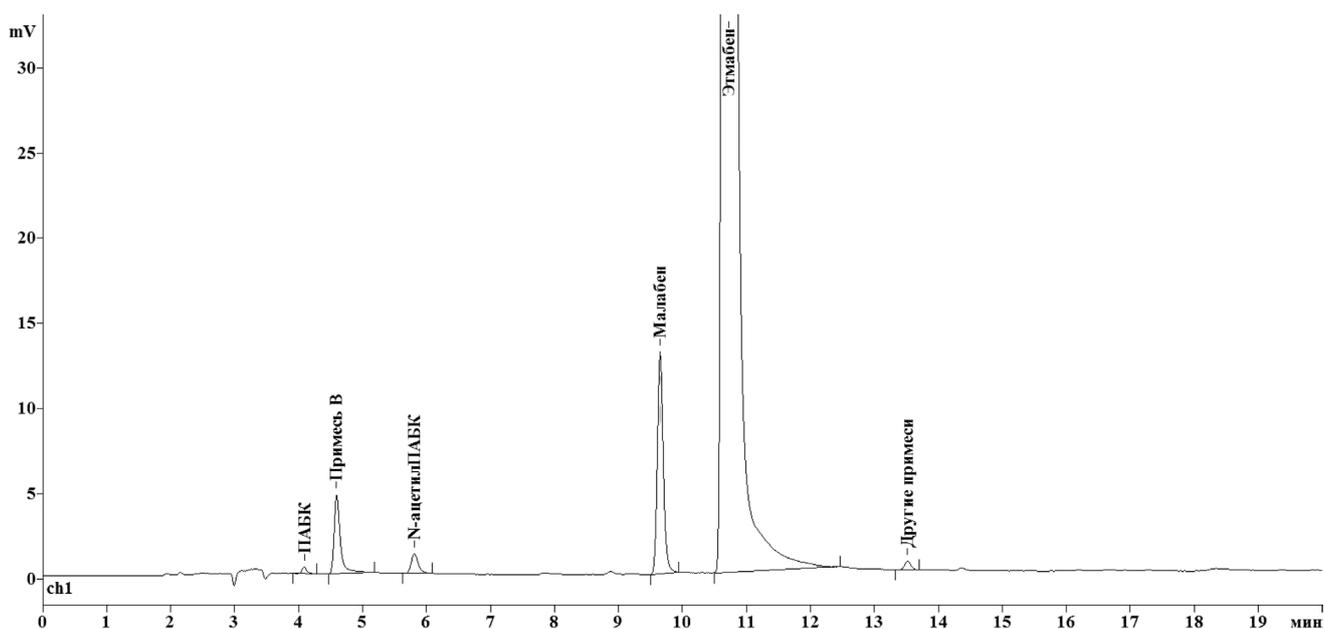


РИС. 2. Хроматограмма испытуемого раствора этмабена концентрацией 0,2 мг/мл

РАСЧЕТ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ ПРИМЕСЕЙ

| Примесь | Площадь пика аналита S, mV · сек | Площадь пика стандарта S, mV · сек | Концентрация стандарта примеси, мг/мл | Количественное содержание, % |
|-------------------------------|--|--|---|---------------------------------|
| Примесь А | 1,98 | – | – | <0,05% |
| Примесь В | 29,16 | 43,52 | $5,30 \times 10^{-4}$ | 0,17 |
| Примесь С | 9,12 | 17,46 | $2,22 \times 10^{-4}$ | 0,056 |
| Примесь D | 95,49 | 188,2 | $2,68 \times 10^{-3}$ | 0,34 |
| Суммарное содержание примесей | | | | 0,57 |

В исследуемом образце этмабена обнаружены родственные примеси А, В, С и D. Установлено, что содержание примеси А ниже 0,05%, поэтому оценку ее количественного содержания не проводили. Для определения остальных примесей были записаны хроматограммы единичных примесей в концентрациях, близких к обнаруженным значениям.

Площади пиков и содержание примесей приведены в табл. 2.

Потеря массы при высушивании

Содержание влаги определялось измерением потери массы при высушивании, которое для исследуемого образца составило 0,089%, его расширенная неопределенность – 0,048%.

Определение остаточных органических растворителей методом ГХ

Определение остаточных органических растворителей (ООР) проводили в условиях, описанных выше, для количественной оценки использовали метод внешнего стандарта. Наложение хроматограмм стандартного и испытуемого растворов представлено на рис. 3, результаты определения – в табл. 3.

В ходе определения о-ксилола на полученной хроматограмме соответствующий ему пик отсутствовал, что говорит о его содержании ниже предела обнаружения. Отсутствие о-ксилола было подтверждено альтернативной методикой анализа.

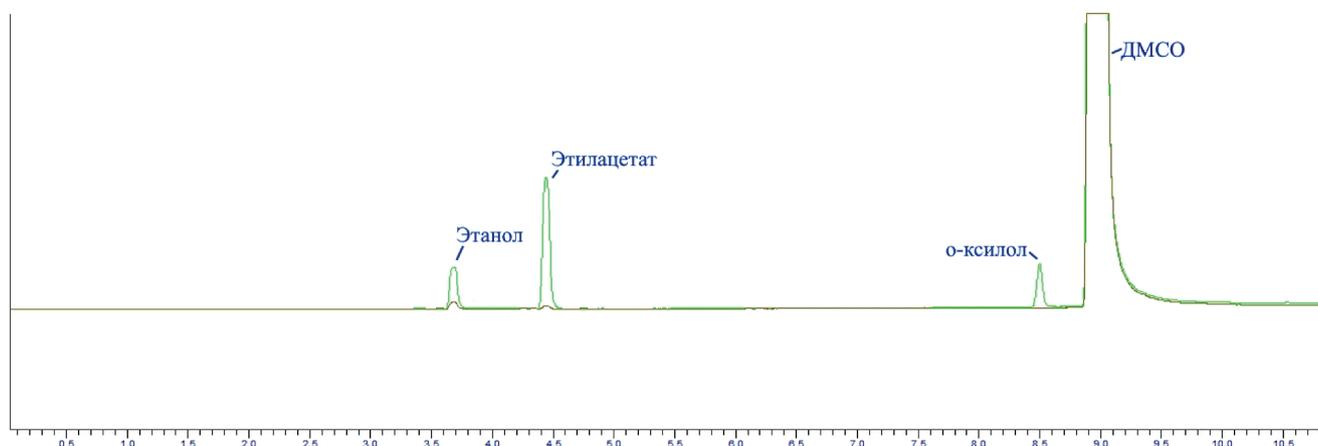


РИС. 3. Наложение хроматограмм стандартного и испытуемого растворов при определении ООР (ДМСО – растворитель проб)

Таблица 3

РАСЧЕТ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ ОСТАТОЧНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

| ООР | Площадь пика аналита $S, mV \cdot сек$ | Площадь пика стандарта $S, mV \cdot сек$ | Количественное содержание, % |
|-------------------------------|---|---|------------------------------|
| Орто-ксилол | – | 44,124 | – |
| Этанол | 9,631 | 56,956 | 0,109 |
| Этилацетат | 3,606 | 165,096 | 0,013 |
| Суммарное содержание примесей | | | 0,122 |

Метод материального баланса

Количественное определение этмабена по принципу материального баланса представлено в табл. 4.

Для оценки полученного результата по методу материального баланса была подсчитана неопределенность определения содержа-

ния – промежуточные и конечный результаты представлены в табл. 5.

Таким образом, неопределенность методики определения содержания этмабена по принципу материального баланса составляет 99,2%, а расширенная неопределенность для этого метода – 3,2%.

Таблица 4

РАСЧЕТ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ ЭТМАБЕНА ПО ПРИНЦИПУ МАТЕРИАЛЬНОГО БАЛАНСА

| $X_{орг. прим.}$ | X_{H_2O} | $X_{ООР}$ | $W, \%$ |
|------------------|------------|-----------|---------|
| 0,57 | 0,0893 | 0,122 | 99,22 |

Таблица 5

НЕОПРЕДЕЛЕННОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА ПО МЕТОДУ МАТЕРИАЛЬНОГО БАЛАНСА

| Источник неопределенности | | Количественное содержание, % | Расширенная неопределенность, % |
|---------------------------|------------|------------------------------|---------------------------------|
| Родственные примеси | Примесь В | 0,17 | 0,05 |
| | Примесь С | 0,056 | 0,012 |
| | Примесь D | 0,35 | 0,15 |
| ООР | Этанол | 0,109 | 0,03 |
| | Этилацетат | 0,013 | 0,006 |
| Влага | | 0,0893 | 0,06 |
| Этмабен | | 99,2 | 3,2 |

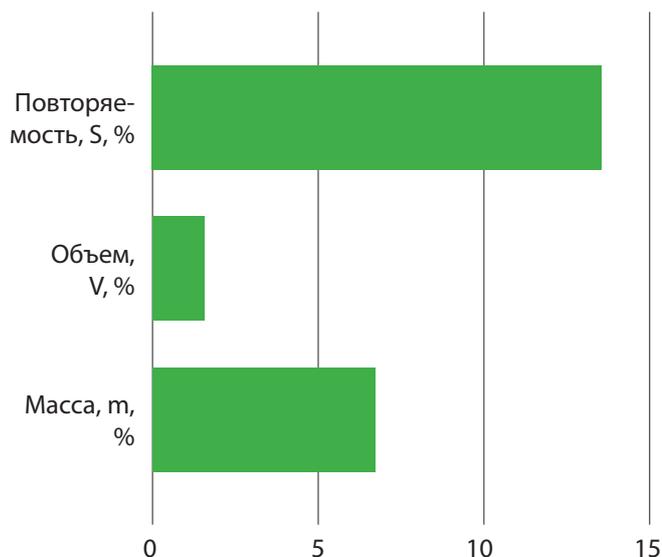


РИС. 4. Вклад в неопределенность различных источников погрешностей в методе материального баланса

На диаграмме (рис. 4) изображен вклад источников в неопределенность результатов анализа методом материального баланса (объем, масса и повторяемость площадей пиков).

Результаты расчета показывают, что наибольший вклад в неопределенность вносит погрешность повторяемости площадей пиков, а наименьший – погрешность используемой посуды.

Метод материального баланса требует количественной оценки всех компонентов, которые могут содержаться в анализируемом образце, что практически невозможно

реализовать. Самым критичным показателем при этом являются родственные примеси. При использовании метода ВЭЖХ аналитик никогда не может быть уверен в том, что в данных условиях анализа обнаружены все примеси (пики могут соэлюироваться, не детектироваться в выбранных условиях). Кроме того, для количественного определения необходимо наличие стандартных образцов всех примесей, что не всегда доступно, тем более при стандартизации оригинальных молекул. Распространенный метод внутренней нормализации площадей пиков для оценки содержания примесей не может быть применен без знаний коэффициентов чувствительности, для определения которых также требуется наличие стандартных образцов примесей.

Титриметрический метод количественного определения этмабена в образце

Результаты кислотно-основного титрования и статистическая обработка представлены в табл. 6. Полученная величина относительного стандартного отклонения (RSD) свидетельствует о высокой воспроизводимости определения.

Для алкалиметрического определения этмабена также была рассчитана неопределен-

Таблица 6

РЕЗУЛЬТАТЫ КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО ТИТРОВАНИЯ

| № пробы | Масса навески, г | Объем титранта, мл | Массовая доля, % | Статистическая обработка |
|------------------------------------|------------------|--------------------|------------------|---|
| 1 | 0,0990 | 20,00 | 99,78 | $\bar{P} = 99,04\%$ $\Delta P = 0,8\%$ $P = 99,0 \pm 0,8\%$ $RSD = 0,64\%$ |
| 2 | 0,1007 | 20,10 | 98,58 | |
| 3 | 0,0993 | 19,80 | 98,49 | |
| 4 | 0,0991 | 20,00 | 99,68 | |
| 5 | 0,1006 | 20,10 | 98,68 | |
| Количественное содержание этмабена | | | 99,04 | – |

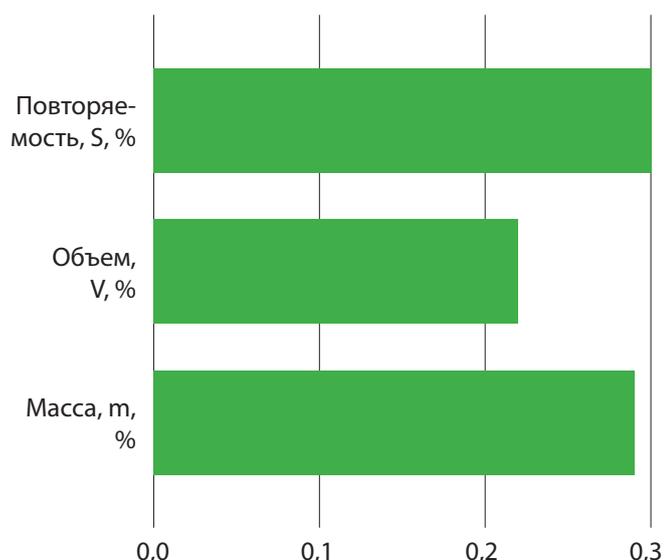


РИС. 5. Вклад в неопределенность различных источников погрешностей при алкалиметрическом определении образца

ность, конечный результат составляет 99,0%, расширенная неопределенность – 1,8%. Вклад различных источников погрешностей изображен на рис. 5.

Вклады всех источников неопределенностей сопоставимы друг с другом.

Метод прямого титриметрического определения основного вещества в образце может характеризоваться низкой специфичностью ввиду совместного титрования родственных примесей, имеющих близкую структуру. Этот факт будет критичен только в случае высокого содержания родственных структур в образце. При этом метод требует значительно меньших трудо- и временных затрат на его реализацию, кроме того, он отягощен

меньшими величинами неопределенностей результата анализа.

Сравнение методов количественного определения

В табл. 7 представлено сравнение метрологических характеристик двух рассмотренных методов количественного определения основного вещества в образце этмабена, рекомендуемых при аттестации стандартных образцов.

Результаты определения этмабена в исследуемом образце с учетом величин неопределенностей двумя методами показывают практически идентичные значения, поэтому в данном случае для оценки аттестованного значения предпочтение следует отдать прямому методу определения.

ВЫВОДЫ

1. Проведено сравнение двух методов анализа стандартного образца 4-((3-оксо-3-этоксипропаноил)амино)бензойной кислоты (этмабена): метода прямого количественного определения (титриметрического анализа) и метода материального баланса. Оба метода анализа показали сходимые результаты.

2. Проведен расчет неопределенности обоих методов. Выявлено, что вклад источников погрешности в неопределенность су-

Таблица 7

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭТМАБЕНА

| | Метод материального баланса | Прямое определение |
|---------------------------------|-----------------------------|--------------------|
| Неопределенность повторяемости | 14% | 0,30% |
| Неопределенность мерной посуды | 1,7% | 0,22% |
| Неопределенность взятия навески | 6,8% | 0,29% |
| Результат определения | 99,2±3,2% | 99,0±1,8% |

щественно отличается в обоих случаях, что хорошо видно в табл. 7. Большой вклад в неопределенность дает погрешность повторяемости в обоих случаях, меньший вклад – погрешности мерной посуды. Неопределенность результата анализа в случае метода материального баланса больше, чем в титриметрическом анализе.

3. По методу прямого количественного определения содержание стандартного образца этмабена с учетом неопределенности результата анализа составило $99,0 \pm 1,8\%$, по методу материального баланса – $99,2 \pm 3,2\%$.

Финансирование

Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России» в рамках соглашения №075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания (ГФ РФ). Федеральная электронная медицинская библиотека [Internet]. URL: <https://femb.ru/record/pharmacopea14> (Дата обращения: 05.10.2022).
2. ГОСТ ISO Guide 30-2019 «Стандартные образцы. Некоторые термины и определения» (2019) // Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. – Москва: Стандартинформ.
3. ГОСТ ISO Guide 35-2015 «Стандартные образцы. Общие и статистические принципы сертификации (аттестации)» (2015) // Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. – Москва: Стандартинформ.
4. Ивкин Д.Ю., Карпов А.А. Экспериментальная оценка эффективности и безопасности нового производного пропандиовой кислоты с кардиотропным действием // Биомедицина. – 2022. – Т. 18. – №3. – С. 109–112.
5. Generalova Y., Sipkina N., Alekseeva G. Determination of related impurities in a new active pharmaceutical ingredient – Sodium 4,4'-(propanediamido) dibenzoate // Microchemical Journal. – 2021. – V. 168. – P. 106498.
6. Эпштейн Н.А. Об аттестации стандартных образцов в фармации: метод баланса масс // Химико-фармацевтический журнал. – 2017. – Т. 51. – №10. – С. 48–57.

APPROACHES TO THE CERTIFICATION OF A REFERENCE STANDARD OF 4-((3-OHO-3-ETHOXYPROPANOYL)AMINO)BENZOIC ACID (ETMABEN)

Adamova A.A., Mikhailova P.A., Zelentsova A.B., Generalova Yu.E.

St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University (SPCFU), St. Petersburg

This article presents a comparative analysis of the method of direct quantitative determination (titrimetry) and the material balance method. The latter method is the recommended for the quantitative determination of reference standards. However, due to the great number of procedures and operations, the material balance method theoretically introduces a much larger error than titrimetry. In order to compare them, the quantitative determination of the etmaben reference standard was carried out in two ways. Alkalimetry was chosen as a direct quantitative determination. The material balance method included the determination of related impurities by high-performance liquid chromatography (HPLC),

residual organic solvents by gas chromatography (GC) and moisture by the study of mass loss during drying. As a result of the study, the uncertainty of the analysis results was calculated and the contribution to the uncertainty of the main sources of measurement error was clarified. According to the method of direct quantitative determination, the content of the standard sample of etmaben was 99.0%, the extended uncertainty of the result was 1.8%, according to the method of material balance – 99.2%, the extended uncertainty of the result – 3.2%. According to these results, the uncertainty of the material balance method is greater than in the titrimetric analysis.

Keywords: etmaben, standard sample, quantitative determination, material balance method, alkalimetry.