

УДК 543-4

<https://www.doi.org/10.34907/JPQAI.2022.61.51.003>

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЛЯ АТТЕСТАЦИИ ПЕРВИЧНОГО СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА НОВОГО АНАЛЬГЕЗИРУЮЩЕГО СРЕДСТВА – 1-(ФЕНИЛ [ФЕНИЛИМИНО]МЕТИЛ) ПИРРОЛИДИН-2,5-ДИОНА

Ю.А. Труханова, магистрант кафедры органической химии, ассистент кафедры аналитической химии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета (СПХФУ), г. Санкт-Петербург, truhanova.yuliya@pharminnotech.com, ORCID: 0000-0002-4335-4488

Г.М. Алексеева, канд. хим. наук, доцент, зав. кафедрой аналитической химии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета (СПХФУ), г. Санкт-Петербург, galina.alexeeva@pharminnotech.com

И.П. Яковлев, доктор хим. наук, профессор, зав. кафедрой органической химии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета (СПХФУ), г. Санкт-Петербург, igor.yakovlev@pharminnotech.com

Е.В. Куваева, канд. фарм. наук, доцент кафедры органической химии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета (СПХФУ), г. Санкт-Петербург, elena.kuvaeva@pharminnotech.com, ORCID: 0000-0002-1894-884X

В статье представлен подход к разработке методики количественного определения для аттестации первичного стандартного образца нового анальгезирующего средства – 1-(фенил[фенилимино]метил)пирролидин-2,5-диона (ФФМП) путем титрования по методу Кьельдаля. Ввиду неспецифичности данного метода и большой вероятности наличия в аттестуемой субстанции азотсодержащих примесей было предложено провести очистку аттестуемого вещества до максимально возможной степени чистоты. С целью подтверждения чистоты субстанции была разработана и валидирована методика анализа по показателю «предельное содержание родственных примесей» методом ВЭЖХ. Хроматографическое разделение достигалось на фазах ацетонитрил / 0,15% водный раствор муравьиной кислоты (рН 2,5) в градиентном режиме на колонке Tosoh ODS (4,6 × 250 мм, 5 мкм) со скоростью

потока 1,0 мл/мин за 35 минут. Регистрация сигнала осуществлялась с помощью многоволнового УФ-детектора при длине волны 257 нм. По валидированной методике было доказано, что чистота субстанции составляет 100,0%. По методу Кьельдаля проведена количественная оценка содержания основного вещества в очищенной субстанции ФФМП, аттестованное значение составило 99,7±0,2%.

Ключевые слова: 1-(фенил[фенилимино]метил)пирролидин-2,5-дион, Кьельдаль, стандартный образец, аттестация, специфичность

Разработка новых биоактивных молекул – актуальный вопрос развития сферы здравоохранения. Решение данной нетривиальной задачи требует большого количества ресурсов, в силу этого необходима минимизация

ошибок, связанных с ложной интерпретацией начальных данных для дальнейшего этапа разработки. Когда пройдены первые этапы разработки и проведен целенаправленный синтез новой биоактивной молекулы, разработчики сталкиваются с проблемой отсутствия стандартных образцов для аналитического контроля содержания основного вещества в исследуемой молекуле, что важно оценивать уже на этапе доклинических исследований. Данная проблема может быть решена путем аттестации первичного стандартного образца новой молекулы.

Основным методом аттестации первичных стандартных образцов является метод баланса масс [1–3]. В ходе аттестации при анализе содержания родственных примесей методом ВЭЖХ, согласно [3], необходимо идентифицировать примеси аттестуемого вещества (при их наличии) с целью дальнейшего синтеза и установления коэффициентов чувствительности и коэффициентов пересчета каждой отдельной примеси для их количественной оценки в аттестуемом образце. Однако этот способ имеет множество недостатков, таких как увеличение времени и затрат на аналитическую разработку. Более того, при применении такого подхода любое количественное определение единичной примеси вносит свой вклад в неопределенность аттестованного значения.

Для решения данного вопроса наиболее оптимальным, с нашей точки зрения, является первоначальная доочистка аттестуемого образца до 100,0% чистоты либо до такой степени чистоты, чтобы содержание примесей в сумме было не более относительного стандартного отклонения (% RSD) сходимости результатов используемого абсолютного метода количественного определения. С целью доказательства чистоты необходимо разработать и валидировать методику анализа на предельное содержание примесей. Одним из наиболее удобных вариантов является применение

высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [4].

Стоит отметить, что применяемая методика прямого количественного определения будет заведомо пригодна лишь для определения содержания основного вещества только в очищенном образце, что является недостатком данного подхода. Однако в рутинном анализе для нахождения количественного содержания возможно использовать уже разработанную методику ВЭЖХ с доказанной специфичностью с применением аттестованного стандартного образца [5].

Целью исследования стала очистка аттестуемого образца субстанции ФФМП до максимально возможной чистоты, доказательство чистоты по разработанной и валидированной методике определения предельного содержания родственных примесей для дальнейшего количественного определения методом Кьельдаля.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1-фенил (фенилимино) метил) пирролидин-2,5-дион (ФФМП) синтезирован на кафедре органической химии Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета по внутреннему протоколу 03122021/ТJA-1 [6] и дополнительно перекристаллизован из спирта этилового. Все анализы выполнены на стандартном лабораторном сырье квалификации «для ВЭЖХ» и «х.ч.».

Анализ методом ВЭЖХ-УФ осуществлялся на жидкостном хроматографе Agilent 1100 с УФ-детектором. Хроматографическое разделение проводили на колонке с обращенной фазой – Tosoh ODS (4,6 × 250 мм, размер частиц 5 мкм). Подвижная фаза состояла из 0,15% раствора муравьиной кислоты (А) (рН 2,5±0,1) и ацетонитрила (Б). Программа градиентного элюирования была подобрана следующим образом (время, фаза А, %): 0 (90), 10 (50), 25 (50),

30 (10), 32 (10), 33 (90), 35 (90). Скорость потока – 1,0 мл/мин. Температура колонки – 40°C. Объем инъекции – 6 мкл, УФ-детектирование проводили при длине волны 257 нм.

Испытуемый раствор ФФМП для анализа методом ВЭЖХ готовили в концентрации 0,5 мг/мл. Растворитель – ацетонитрил.

Для построения калибровочного графика и определения предела обнаружения методики готовили растворы с концентрациями 0,05%, 0,08%, 0,10%, 0,12%, 0,15% от номинальной концентрации испытуемого раствора путем разбавления испытуемого раствора.

Для валидации разработанной методики ВЭЖХ по показателю «предельное содержание родственных примесей» было необходимо оценить следующие валидационные характеристики: специфичность, правильность и предел обнаружения родственных примесей (ОФС.1.1.0012.15) [7].

Специфичность устанавливали, исходя из условий: на хроматограмме бланк-раствора (ацетонитрил) не должно быть пика, время удерживания которого совпадает со временем удерживания пика стандартного образца ФФМП; на хроматограммах стресс-тестирования при добавлении перекиси водорода и соляной кислоты разрешение между пиком основного вещества и пиком ближайшей к нему примеси должно быть не менее 1,5 (ОФС.1.2.1.2.0001.15) [7].

Для нахождения предела обнаружения родственных примесей анализировали пять калибровочных растворов с трехкратной инъекцией в диапазоне концентраций от 0,05 до 0,15. Значение предела обнаружения рассчитывали согласно ОФС.1.1.0013.15 [7].

Правильность оценивали по свободному члену линейной регрессии (коэффициент a) при условии линейности калибровочного графика. Заключение о правильности методики устанавливали при статистической незначимости свободного члена линейной регрессии ($a < \Delta a$).

Для анализа субстанции ФФМП по показателю «количественное определение» методом Кьельдаля около 200 мг (точная навеска) испытуемой субстанции помещали в плоскодонную колбу со шлифом, добавляли 1,0 г растертой смеси меди сернокислой пятиводной, селена и сульфата калия (1:1:4), вносили 7 мл концентрированной серной кислоты и взбалтывали.

Количественное определение методом Кьельдаля проводили согласно ОФС.1.2.3.0011.15 [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики анализа предельного содержания родственных примесей осуществлялась на технических образцах ФФМП. Для анализа была выбрана гидрофилизированная колонка Tosoh ODS (4,6 × 250 мм, 5 мкм), так как в испытуемом образце присутствовали гидрофильные примеси, элюирующиеся в мертвом объеме. Скорость потока подвижной фазы, условия градиентного режима и время анализа были подобраны таким образом, чтобы наблюдалось наилучшее разрешение между пиками основного вещества и сопутствующих примесей (более 1,5, согласно [7]).

На рис. 1 и 2 представлены хроматограммы после проведения частичной дегградации.

Согласно полученным данным, на обеих хроматограммах (рис. 1, 2) разрешение между пиком основного вещества и пиком наиболее близко расположенной примеси составляет более 1,5, что соответствует заданным критериям приемлемости.

Для нахождения предела обнаружения был построен калибровочный график (рис. 3). Предел обнаружения – $4,5 \times 10^{-5}$ мг/мл, что составляет $8 \times 10^{-3}\%$ от концентрации испытуемого раствора (0,5 мг/мл).

По калибровочному графику и уравнению линейной регрессии была доказана

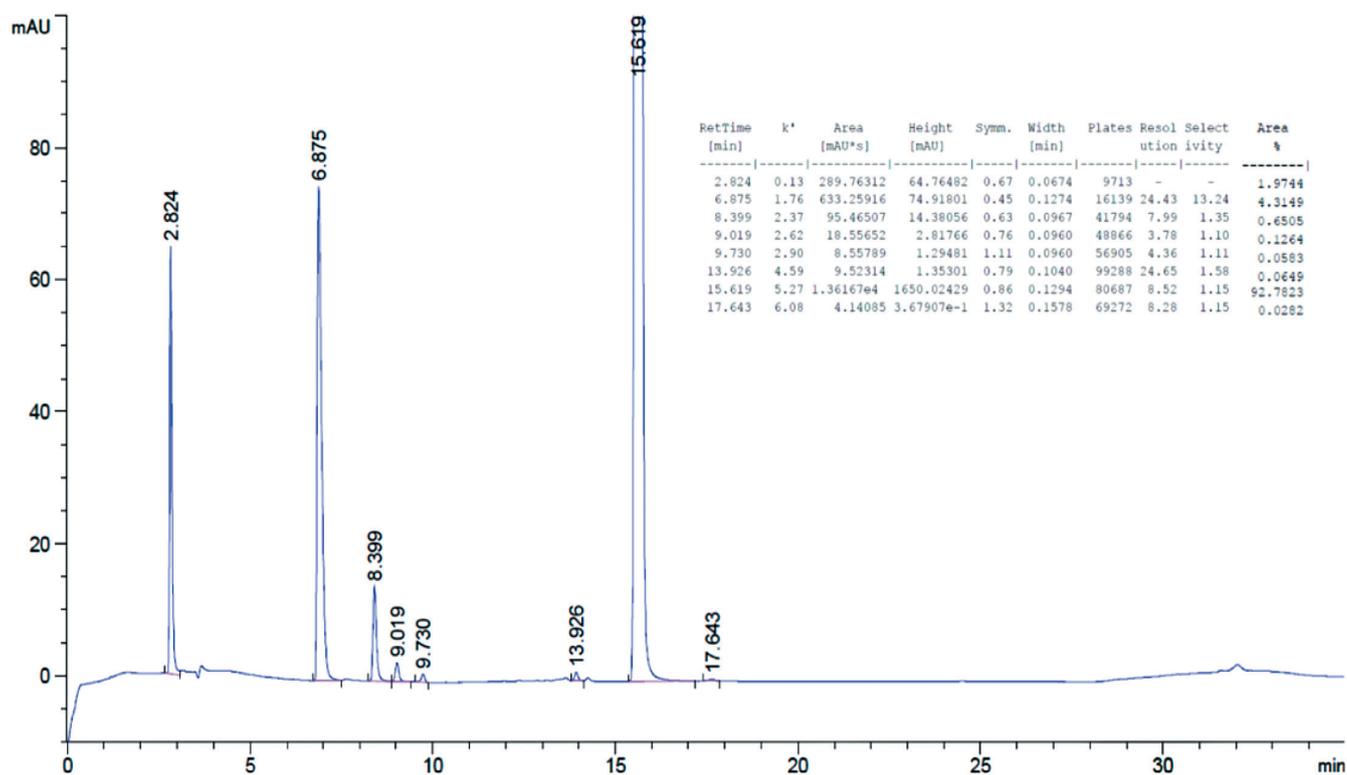


РИС. 1. Хроматограмма раствора вещества ФМП при действии перекиси водорода при 257 нм

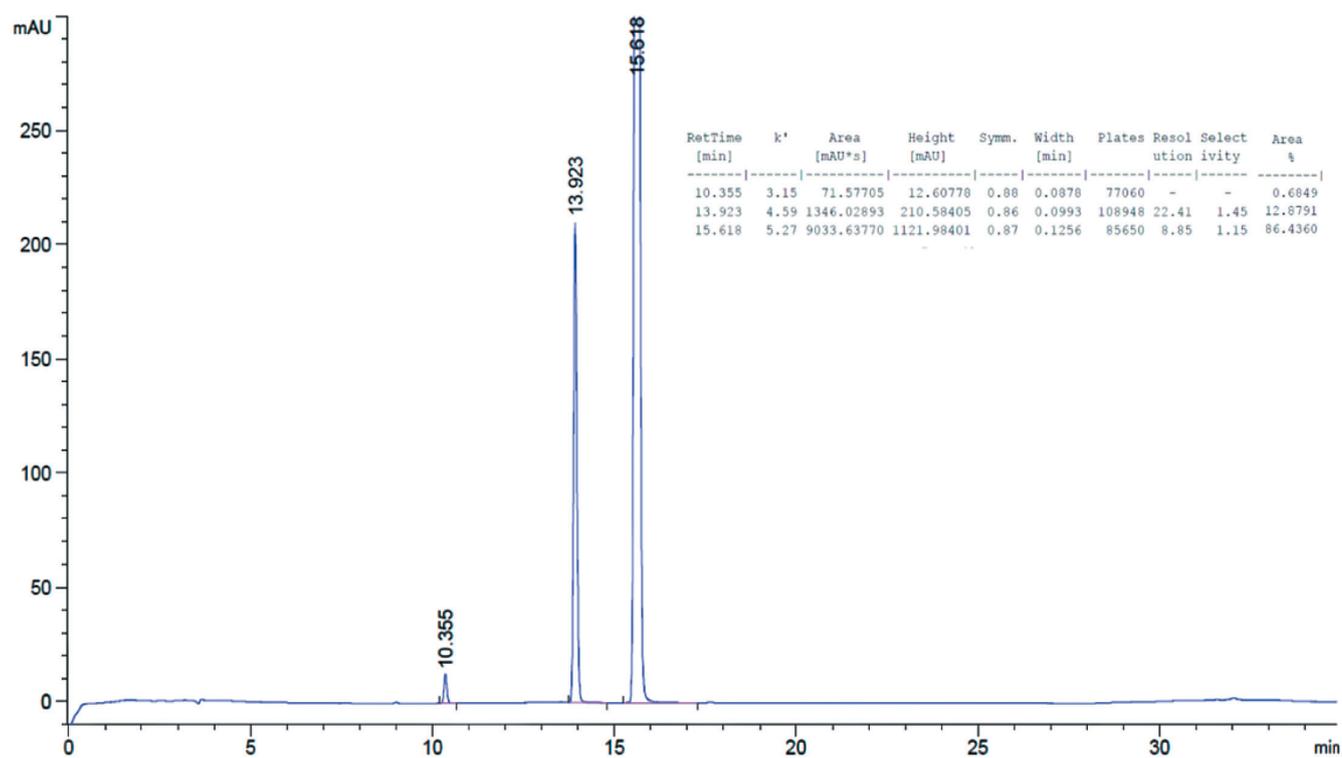


РИС. 2. Хроматограмма раствора вещества ФМП при действии 1 М раствора соляной кислоты при 257 нм

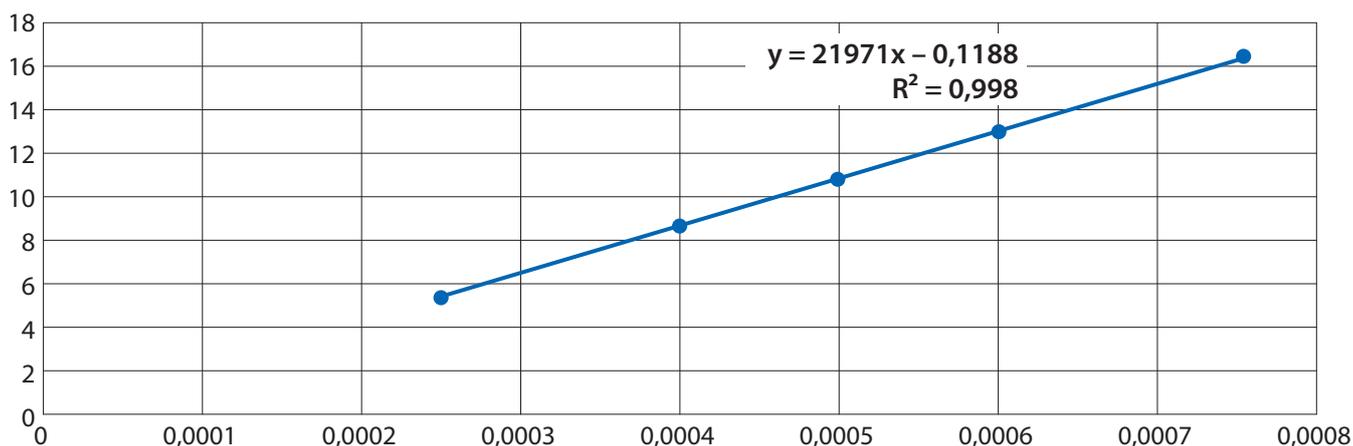


РИС. 3. Калибровочный график для оценки предела обнаружения родственных примесей

правильность: $R=0,999$, $0,12 < 0,83$, $t_a=0,40 < t_{табл}=3,18$ ($P=95\%$, $f=3$).

Для анализа по показателю «количественное определение» была проведена перекристаллизация образца ФФМП из этилового спирта. На рис. 4 представлена хроматограмма очищенной субстанции ФФМП при длине волны 257 нм. Как видно из приведенной хроматограммы, пики примесей не обнаружены.

После анализа предельного содержания родственных примесей для образца ФФМП

и доказательства 100,0% чистоты значение содержания основного вещества в образце определяли методом Кьельдаля по результатам титрования 6 проб. По результатам анализа находили среднее значение и рассчитывали величину % RSD, которая не должна превышать 0,35%. Результаты исследования приведены в табл. 1.

По результатам титрования содержание основного вещества в субстанции ФФМП составило $99,7 \pm 0,2\%$.

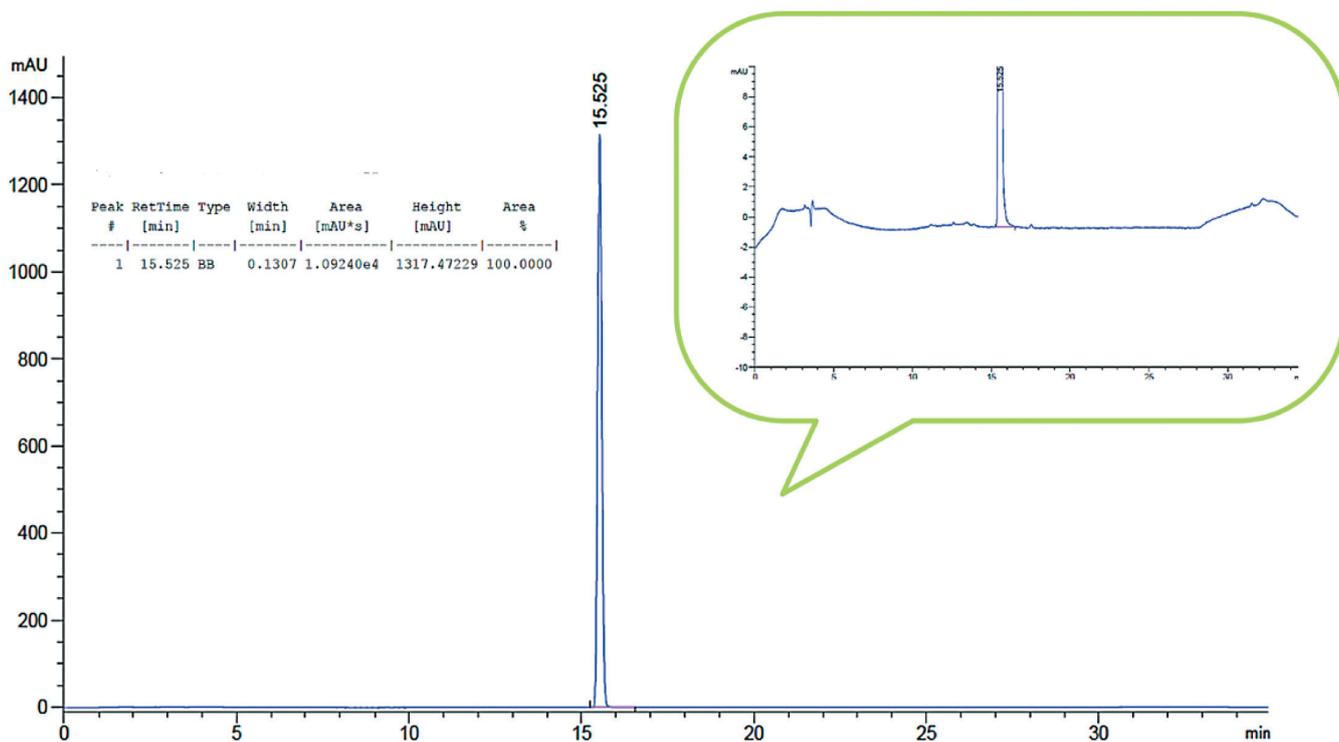


РИС. 4. Хроматограмма испытуемого образца ФФМП при длине волны 257 нм

Таблица 1

РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА ФФМП ПО ПОКАЗАТЕЛЮ «КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ» МЕТОДОМ КЬЕЛЬДАЛЯ

№ пробы	Масса навески, мг	Объем титранта, мл	Результат (P), %	Статистическая обработка
1	198,2	12,9	99,7	$\bar{P} = 99,7\%$ $SD = 0,22$ $RSD = 0,2\%$
2	203,2	12,7	99,5	
3	196,8	12,9	100,1	
4	200,3	12,8	99,5	
5	203,2	12,7	99,7	
6	199,9	12,8	99,8	

ВЫВОДЫ

1. Разработана методика количественного определения первичного стандартного образца нового анальгезирующего средства – 1-(фенил [фенилимино]метил)пирролидин-2,5-диона (ФФМП) путем титрования по методу Кьельдаля. Ввиду неспецифичности данного метода и большой вероятности наличия в аттестуемой субстанции азотсодержащих примесей была проведена очистка аттестуемого вещества до максимально возможной степени чистоты.

2. С целью подтверждения чистоты субстанции разработана и валидирована методика анализа по показателю «предельное содержание родственных примесей» методом ВЭЖХ. В ходе валидации разработанной методики ВЭЖХ доказана специфичность и правильность, найдено значение предела обнаружения единичной примеси, который составил $8 \times 10^{-3}\%$ от концентрации испытуемого раствора 0,5 мг/мл.

3. По валидированной методике определения предельного содержания примесей чистота субстанции составила 100,0%.

4. По методу Кьельдаля проведена количественная оценка содержания основного вещества в субстанции ФФМП, аттестованное значение составило $99,7 \pm 0,2\%$.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Davies S.R., Alamgir M., Chan B.K. H. The development of an efficient mass balance approach for the purity assignment of organic calibration standards // *Anal. Bioanal. Chem.* 2015. №407, P. 7983–7993. DOI: 10.1007/s00216-015-8971-0
2. Epstein N.A. Certification of Reference Standards in Pharmacy: Mass Balance Method // *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2017. Vol. 51. №10. P. 48–57. DOI: 10.1007/s11094-018-1718-4.
3. Руководство по разработке частных фармакопейных статей Фармакопеи Евразийского экономического союза. Часть 1. Субстанции для фармацевтического применения химического происхождения. 2019 г.
4. Pfeifer C., Fassauer G., Gerecke H. Purity determination of amphotericin B, colistin sulfate and tobramycin sulfate in a hydrophilic suspension by HPLC // *J. Chromatogr. B.* 2015. №990. P. 7–14. DOI: 10.1016/j.jchromb.2015.02.043
5. Trukhanova Y.A., Alekseeva G. M, Yakovlev I.P., Spiridonova D.V. Attestation of the primary standard sample of a new analgesic agent 1-phenyl (phenylimino) methylpyrrolidine-2,5-dione, development and validation of a method for quantitative determination of the substance by HPLC // *Microchem. J.* Vol. 173,

- February 2022, 106991, 2022. DOI: 10.1016/j.microc.2021.106991
6. Trukhanova Y.A., Kolesnik D.A., Yakovlev I.P., Spiridonova D.V., Yuskovets V.N., Kuvaeva E.V., Ksenofontova G.V., Semakova T.L. An efficient synthesis and characterization of novel (Z)-1-phenyl(phenylamino)methylpyrrolidine-2,5-dione derivatives as potential analgesic agents // *Chemical Data Collections*, 2021. №35. P. 100770. DOI: 10.1016/j.cdc.2021.100770
7. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания (ГФ РФ). Федеральная электронная медицинская библиотека. [Internet]. URL: <https://femb.ru/record/pharmacopea14>. (Дата обращения: 20.03.2022).

DEVELOPMENT OF A QUANTITATIVE DETERMINATION METHODOLOGY FOR THE CERTIFICATION OF THE PRIMARY STANDARD SAMPLE OF A NEW ANALGESIC AGENT – 1-(PHENYL[PHENYLIMINO]METHYL)PYRROLIDINE-2,5-DIONE

Yu.A. Trukhanova, G.M. Alekseeva, I.P. Yakovlev, E.V. Kuvaeva

St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia

The article presents an approach to the development of a quantitative determination technique for the certification of the primary standard sample of a new analgesic agent – 1-(phenyl[phenylimino]methyl)pyrrolidine-2,5-dione (FFMP) by titration using the Kjeldahl method. Due to the non-specificity of this method and the high probability of the presence of nitrogen-containing impurities in the certified substance, it was proposed to purify the certified substance to a high degree of purity. In order to confirm the purity of the substance, a method of analysis for the indicator «Limit content of related impurities» by HPLC was developed and validated. Chromatographic separation was achieved at the acetonitrile / 0.15% aqueous formic acid solution (pH 2.5) phases in a gradient mode on a Tosoh ODS column (4.6 × 250 mm, 5 microns) with a flow rate of 1.0 ml/min in 35 minutes. The signal was recorded using a multi-wave UV detector at a wavelength of 257 nm. According to the validated method, it was proved that the purity of the substance is 100.0%. According to the Kjeldahl method, a quantitative assessment of the content of the main substance in the purified FFMP substance was carried out, the certified value was 99.7±0.2%.

Keywords: 1-(phenyl[phenylimino]methyl)pyrrolidine-2,5-dione, Kjeldahl, standard sample, certification, specificity