

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОСТОРОННЕЙ ПРИМЕСИ В СУБСТАНЦИИ АМИДА N-АЛЛИЛАНТРАНИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

Карпенко Ю.Н.¹, Басс С.М.¹, Ярыгина Т.И.¹

¹ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Пермь, Россия (614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2), e-mail: perm@pfa.ru

Синтезировано новое биологически активное соединение амид N-аллилантраниловой кислоты (ANAAK). Постороннюю примесь (исходный продукт синтеза) – амид антраниловой кислоты (AAK) определяли обращённо-фазной ВЭЖХ. Анализ проводили на колонке C18 (25 см×4,6 мм, сорбент Discovery® C18 с размером частиц 5 мкм). Подвижная фаза: ацетонитрил – 0,1%-ный раствор трифторуксусной кислоты (30:70), скорость потока подвижной фазы – 1 мл/мин, длина волны детектирования – 212 нм, объем вводимой пробы – 20 мкл, температура термостата колонки – 40 °С. Линейность разработанной методики определяли на пяти уровнях концентраций ААК в пределах 0,05-0,5% от содержания основного вещества – субстанции ANAAK. Предел обнаружения и количественного определения ААК составил соответственно 0,5 мкг/мл и 1 мкг/мл. Оценку повторяемости методики проводили в пределах концентраций ААК 1-10 мкг/мл. Относительное стандартное отклонение не превышает 10,0%. Определение правильности методики проводили на трех уровнях содержания ААК в ANAAK (0,05, 0,1 и 0,5%). Границы открываемости ААК не выходят за пределы 75–125%, рекомендованные при количественном определении примесей с нормой содержания от 0,1 до 1%.

Ключевые слова: амид N-аллилантраниловой кислоты; амид антраниловой кислоты, валидация, обращённо-фазная ВЭЖХ.

ELABORATION AND VALIDATION OF METHODIC DETERMINATION IMPURITY IN SUBSTANCE OF AMIDE N-ALLYLANTHRANYLIC ACID

Karpenko J.N.¹, Bass S.M.¹, Yarygina T.I.¹

¹«The Perm state pharmaceutical academy» Ministry of Health of Russian Federation, Perm, Russia (614990, Perm, Polevaya st.) e-mail: perm@pfa.ru

New biologically active substance amide N-allylanthranylic acid (ANAAA) was synthesized. The impurity (the initial product of synthesis) - amid anthranilyc acid (AAA) was determine by reserve phase HPLC. The analysis performed on C18 column (25cm×4,6mm, sorbent Discovery® C18, 5 µm particle size). Mobile phase: acetonitrile / 0,1% solution of trifluoroacetic acid (30:70 v/v), the flow rate of mobile phase – 1 ml/min, the wave length of detection – 212 nm, the volume of pumped sample - 20 µl, the temperature of column – 40 °C. Linearity of elaborated methodic determined on the five levels of concentration in the range of 0,05-0,5% from the content of active substance - ANAAA. The limit of detection and limit of quantitation of AAA were 0,5 µg/ml и 1 µg/ml, respectively. Evaluation repeatability of methodic conducted in the range of 1-10 µg/ml. The relative standard deviation (RSD) was no more than 10%.The determination of accuracy conducted on the three levels of concentration AAA in ANAAA (0,05, 0,1 and 0,5%). Limit of recovery of AAA don't get out from 75 – 125% which recommended to quantitation the impurity with standard of content from 0,1 to 1%.

Keywords: amide N-allylanthranylic acid, amid anthranilyc acid, validation, reserve phase HPLC.

Введение

В результате поиска биологически активных соединений в ряду амидов N-замещенных антраниловых кислот [4; 5] выявлено соединение, проявившее наибольший противовоспалительный эффект – амид N-аллилантраниловой кислоты (ANAAK). В связи с рекомендацией к проведению доклинических испытаний нами проводятся исследования по разработке методов контроля качества и стандартизации субстанции и лекарственных форм этого соединения [1].

Исходя из схемы получения ANAAK, посторонней (специфической) примесью в его

субстанции может быть амид антраиловой кислоты (ААК).

Целью настоящей работы явилась разработка и валидация методики определения посторонней примеси ААК в субстанции АНААК методом обращённо-фазной ВЭЖХ.

Материалы и методы исследования

В исследованиях использовался высокоэффективный жидкостный хроматограф «Shimadzu LC Prominence» (Япония), оснащённый колонкой из нержавеющей стали (25 см×4,6 мм, сорбент Discovery® C18 с размером частиц 5 мкм) и диоднолучным детектором.

Для приготовления подвижных фаз использовали воду бидистиллированную, фосфорную кислоту концентрированную, трифторуксусную кислоту, ацетонитрил для хроматографии, метанол [3].

В работе использовали пять серий субстанции АНААК, синтезированные на кафедре фармацевтической химии ФОО ПГФА в 2008-2012 гг., ААК марки Lancaster Synthesis.

Результаты исследований и их обсуждение

Предварительный эксперимент показал, что оптимальным элюентом с точки зрения эффективного разделения аналитов, а также симметрии хроматографических пиков является подвижная фаза на основе ацетонитрила и 0,1%-ного раствора трифторуксусной кислоты в соотношении 30:70. УФ-спектры АНААК в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты характеризуются тремя максимумами поглощения 216 нм, 257 нм и 350 нм ($E_{1\text{см}}^{1\%}$ соответственно 1520, 520 и 320) [2]. Длину волны детектирования (212 нм) выбирали, исходя из полученного спектра ААК в подвижной фазе (рис. 1). Хроматограмма раствора модельной смеси АНААК и ААК (по 200 мкг/мл) в элюенте представлена на рис. 2.

Разработанные условия хроматографического анализа:

- подвижная фаза: ацетонитрил – 0,1%-ный раствор трифторуксусной кислоты (30:70);
- скорость потока подвижной фазы – 1 мл/мин;
- длина волны детектирования – 212 нм;
- объем вводимой пробы – 20 мкл;
- температура термостата колонки – 40 °С.

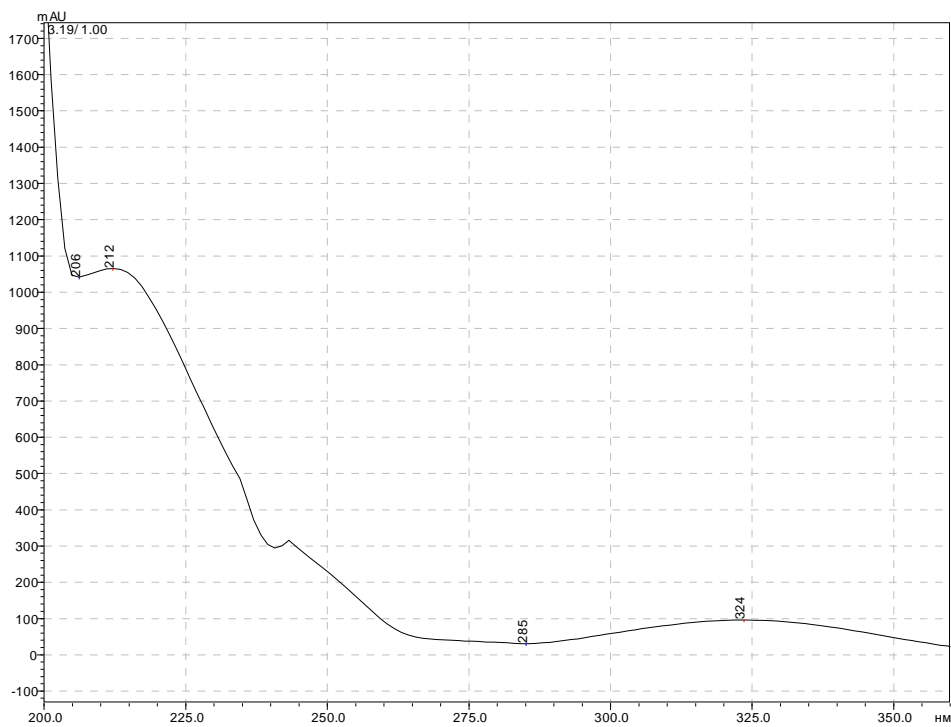


Рис. 1. УФ-спектр ААК в подвижной фазе ацетонитрил – 0,1%-ный раствор трифторуксусной кислоты (30:70).

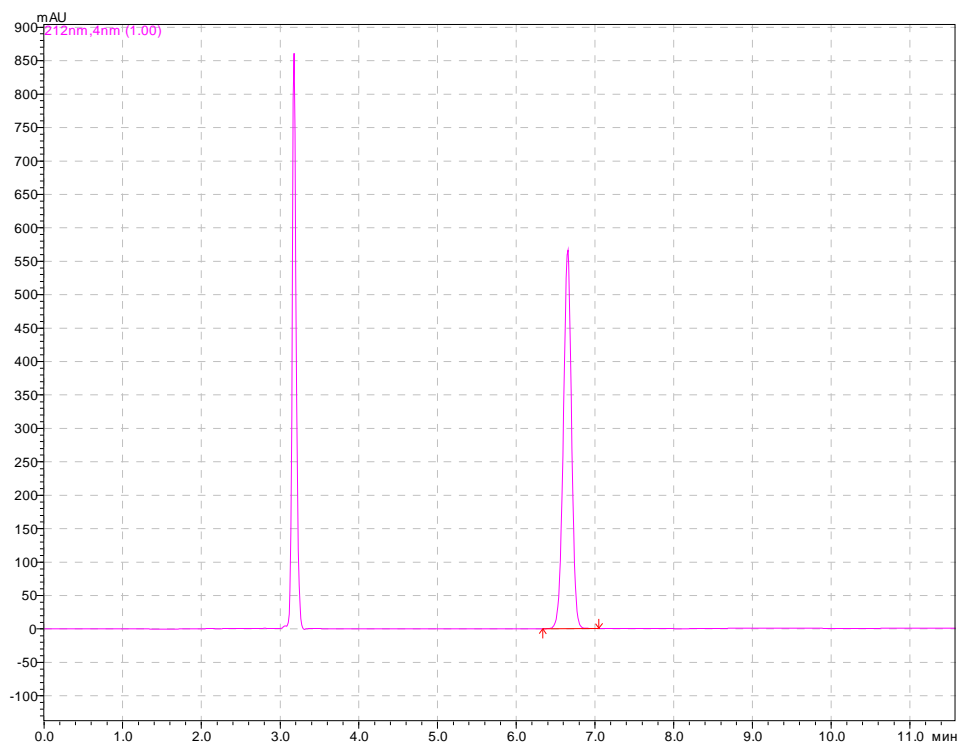


Рис. 2. Хроматограмма раствора модельной смеси ANAAK и ААК (длина волны детектирования 212 нм).

Валидацию аналитической методики проводили по параметрам: специфичность, линейность, правильность, повторяемость (сходимость), предел обнаружения и предел количественного определения.

При подтверждении специфичности использовали модельную смесь субстанции ANAAK (1 мг/мл) и примеси ААК (10 мкг/мл) в подвижной фазе (рис. 3).

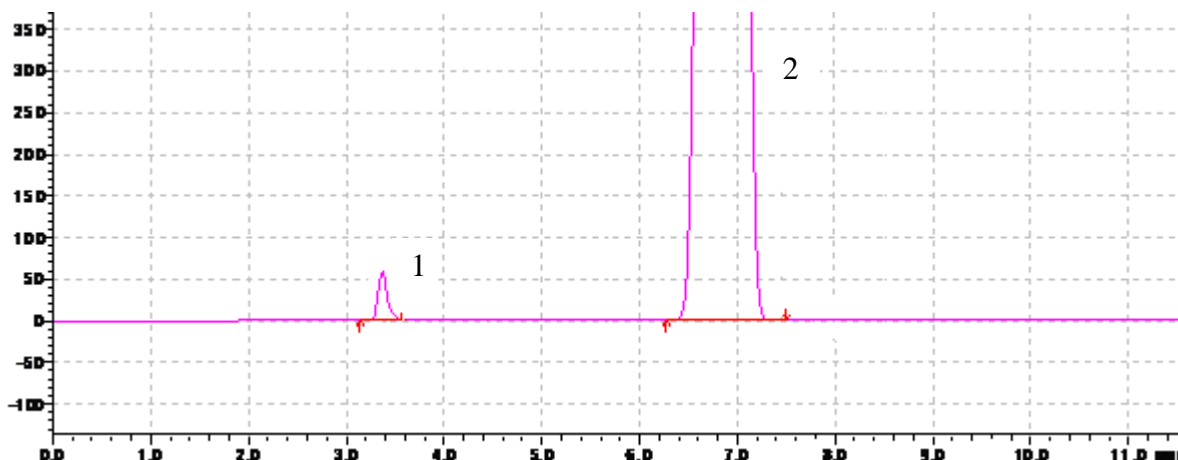


Рис. 3. Хроматограмма модельной смеси ANAAK (1 мг/мл) и примеси ААК (10 мкг/мл) в подвижной фазе.

Идентификацию ААК и ANAAK на хроматограмме осуществляли путем сопоставления времён удерживания аналитов и стандартных образцов. Пик ААК в разработанных условиях имеет время удерживания $3,20 \pm 0,05$ мин, пик ANAAK – $6,72 \pm 0,05$ мин. Анализ «холостой» хроматограммы (растворителя образца) показал отсутствие мешающих посторонних пиков. Коэффициент разрешения (R_s) пика примеси и основного вещества составил 5,4, что свидетельствует о хорошем разделении (рекомендуемое значение R_s при определении содержания примесей больше 2). Коэффициент асимметрии пика ААК, характеризующий надежность определения границ пика, равен 1,1 (рекомендуемое значение – от 0,8 до 1,5). Относительное стандартное отклонение (RSD) площадей пиков ААК для трёх последовательных хроматограмм составило 1,92%.

Линейность методики определяли на пяти уровнях концентраций ААК в подвижной фазе (0,05; 0,1; 0,25; 0,35; 0,5% от содержания основного вещества – субстанции ANAAK). Для этого в мерные колбы вместимостью 25 мл помещали раствор ААК в метаноле с концентрацией 53,5 мкг/мл (0,5, 1,0, 2,5, 3,5 и 5,0 мл) и доводили объем колб метанолом до метки. Коэффициент корреляции составил 0,999, что свидетельствует о линейности методики в выбранном диапазоне концентраций (рис. 4).

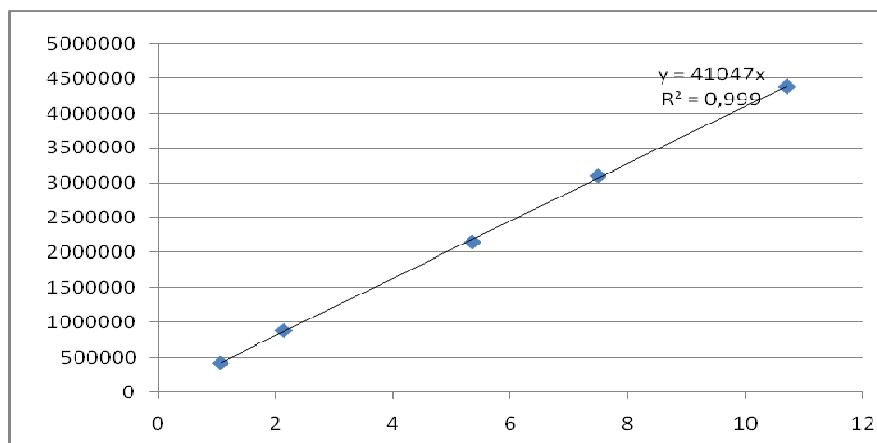


Рис. 4. Зависимость площади пика от концентрации ААК (мкг/мл) в модельных смесях.

Предел обнаружения ААК по предложенной методике составляет 0,5 мкг/мл (0,025% от содержания в субстанции АНААК), предел количественного определения 1 мкг/мл (0,05% от содержания в субстанции АНААК).

Оценку повторяемости методики проводили на модельных растворах ААК на четырех уровнях концентраций: 1, 2, 5 и 10 мкг/мл, что соответствует 0,05; 0,1; 0,25 и 0,5% от содержания в субстанции АНААК. Каждый из растворов готовился в соответствии с тестируемой методикой и хроматографировался не менее 3 раз.

Относительное стандартное отклонение не превышает 10,0%, что свидетельствует об удовлетворительной сходимости результатов на всех уровнях рассматриваемых концентраций (табл. 1).

Таблица 1 – Оценка повторяемости (сходимости) методики определения ААК

Содержание ААК в растворе, мкг/мл	Найденное содержание ААК, мкг/мл	Метрологические характеристики (P=0,95; n=6)				
		n	\bar{X}	SD	RSD	ΔX
1	0,79; 0,87; 0,91; 0,78; 0,89; 0,84	6	0,85	0,053	6,23	0,14
2	2,03; 1,93; 1,95; 2,04; 1,98; 1,95	6	1,98	0,046	2,32	0,12
5	4,84; 5,10; 4,90; 4,89; 5,06; 4,86	6	4,94	0,110	2,22	0,28
10	9,82; 9,88; 10,11; 10,07; 9,93; 9,78	6	9,93	0,133	1,34	0,34

При определении правильности методики (табл. 2) оценивали открываемость известного количества аналита (ААК), введенного в плацебо (субстанцию АНААК). Исследования проведены на трех уровнях содержания ААК в АНААК (0,05, 0,1 и 0,5%). По

0,05 г субстанции ANAAK помещали в мерные колбы вместимостью 25 мл, растворяли в 10 мл метанола, добавляли в каждую колбу раствор ААК в метаноле с концентрацией 50 мкг/мл (0,5, 1,0, 5,0 мл) и доводили объем колб метанолом до метки.

Таблица 2 – Оценка правильности методики определения ААК

Содержание ААК в растворе, мкг/мл	Открываемость (R), %	Метрологические характеристики (P =0,95; n=6)				
		n	\bar{R}	SD	RSD	$\Delta \bar{R}$
1	92,4; 83,6; 102,0; 93,1; 88,2; 96,1	6	92,3	5,83	6,31	6,11
2	94,5; 103,5; 103,0; 97,0; 94,0; 98,5	6	98,42	4,09	4,15	4,29
10	98,8; 99,7; 102,1; 99,1; 101,4; 99,7	6	100,13	1,32	1,32	1,38

Границы открываемости ААК не выходят за пределы 75–125%, рекомендованные при количественном определении примесей с нормой содержания от 0,1 до 1%.

Анализ пяти серий субстанции ANAAK показал, что содержание в них посторонней примеси ААК не превышает 0,1%.

Разработанная методика включена в проект ФС на субстанцию ANAAK.

Выводы

1. Установлены условия определения примеси ААК в субстанции ANAAK методом обращённо-фазной ВЭЖХ.

2. Валидация разработанной методики по параметрам специфичность, линейность, предел обнаружения и предел количественного определения, повторяемость (сходимость), правильность показала её приемлемость для определения 0,05-0,5% примеси ААК в субстанции ANAAK.

Список литературы

1. Басс С.М. Разработка методов оценки качества субстанции амида N–аллилантраниловой кислоты / С.М. Басс, Т.И. Ярыгина, Л.М. Коркодинова [и др.] // Вестн. Рос. ун-та дружбы народов. Сер. Медицина. – 2010. – № 4. – С. 165-167.
2. Басс С.М. Изучение УФ-спектров нового биологически активного амида N-аллилантраниловой кислоты в применении к его идентификации // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. – 2011. – № 8. – С. 104-105.

3. Государственная Фармакопея РФ / М-во здравоохранения Рос. Федерации. – 12-е изд., репринт. – М. : Научный центр экспертиз средств медицинского применения, 2008. – Ч. 1 – 704 с. : ил.
4. Курбатов Е.Р. Синтез, физико-химические свойства и биологическая активность амида N-аллилантраниловой кислоты / Е.Р. Курбатов, А.Б. Шакирова, Л.М. Коркодинова [и др.] // Вестн. Рос. ун-та дружбы народов. Сер. Медицина. – 2010. – № 4. – С. 295-297.
5. Амид N-аллилантраниловой кислоты, проявляющий противовоспалительную, анальгетическую и антигипоксическую активности / А.Б. Шакирова, Л.М. Коркодинова, М.Ю. Васильева [и др.] ; Перм. гос. фармацев. акад. : Пат. 2180656. № 2000119954 ; заявл. 26.07.00 ; опубл. 20.03.02 ; приор. 26.07.00 (Россия). – 3 с.

Рецензенты:

Вихарева Елена Владимировна, доктор фармацевтических наук, доцент, заведующий кафедрой аналитической химии ГБОУ ВПО «ПГФА» Минздрава России, г. Пермь.

Гейн Владимир Леонидович, доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой физической и коллоидной химии ГБОУ ВПО «ПГФА» Минздрава России, г. Пермь.