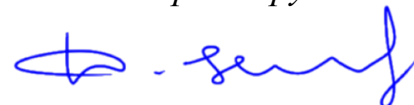


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*



Луценко Дарья Николаевна

**Обоснование норм качества нового биологически активного соединения  
кардиопротекторного действия**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

**Научный руководитель:**  
доктор фармацевтических наук, профессор  
Компанцева Евгения Владимировна

Волгоград – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|  |    |
|--|----|
| ВВЕДЕНИЕ.....  | 6  |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....  | 14 |
| 1.1. Краткая характеристика лекарственных средств кардиопротекторного действия.....                                    | 14 |
| 1.2. Методы анализа биологически активных соединений производных хиназолина .....                                      | 18 |
| 1.2.1. Методы идентификации производных хиназолина.....  | 21 |
| 1.2.2. Методы количественного определения производных хиназолина.....  | 22 |
| 1.2.3. Методы установления родственных примесей .....  | 24 |
| 1.3. Методы анализа лекарственных средств производных гуанидина .....  | 26 |
| 1.3.1. Физико-химические свойства и методы идентификации производных гуанидина .....                                   | 26 |
| 1.3.2. Методы количественного определения производных гуанидина.....   | 32 |
| 1.3.3. Методы определения родственных примесей производных гуанидина .....   | 33 |
| Заключение по главе 1 .....  | 34 |
| ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....  | 35 |
| 2.1. Характеристика объектов, вспомогательных материалов, оборудования и реактивов.....                                | 35 |
| 2.1.1. Оборудование .....  | 35 |
| 2.1.2. Растворители, реактивы, титрованные растворы, индикаторы.....   | 37 |
| 2.2. Методы исследования.....  | 37 |
| ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ <i>N</i> -[2-[4-ОКСО-3(4 <i>H</i> )-ХИНАЗОЛИНИЛ]ПРОПИОНИЛ]-ГУАНИДИНА ..... | 47 |
| 3.1. Изучение физических свойств <i>N</i> -[2-[4-оксо-3(4 <i>H</i> )-хиназолинил]пропионил]-гуанидина.....             | 47 |
| 3.1.1. Описание .....  | 47 |
| 3.1.2. Растворимость.....  | 47 |
| 3.1.3. Температура плавления .....   | 48 |

|   |    |
|---|----|
| 3.2. Показатели контроля качества и пределы нормирования .....  | 49 |
| 3.2.1. Определение рН и кислотности или щелочности.....   | 49 |
| 3.2.2. Прозрачность и цветность растворов.....  | 50 |
| 3.2.3. Определение потери в массе при высушивании, сульфатной золы<br>и тяжелых металлов .....  | 50 |
| 3.3. Разработка методик определения подлинности <i>N</i> -[2-[4-оксо-3(4 <i>H</i> )-<br>хиназолинил]пропионил]-гуанидина .....  | 51 |
| 3.3.1. Изучение спектральных характеристик.....   | 51 |
| 3.3.1.1. Спектрометрия в инфракрасной области.....  | 51 |
| 3.3.1.2. Спектрофотометрия в ультрафиолетовой области .....   | 53 |
| 3.4. Реакции подлинности .....  | 55 |
| Заключение по главе 3 .....   | 57 |
| ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ<br><i>N</i> -[2-[4-ОКСО-3(4 <i>H</i> )-ХИНАЗОЛИНИЛ]ПРОПИОНИЛ]-ГУАНИДИНА .....   | 58 |
| 4.1. Определение констант ионизации .....   | 58 |
| 4.2. Разработка и валидация методики количественного определения<br><i>N</i> -[2-[4-оксо-3(4 <i>H</i> )-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом кислотно-<br>основного титрования .....  | 62 |
| 4.3. Количественное определение <i>N</i> -[2-[4-оксо-3(4 <i>H</i> )-хиназолинил]пропионил]-<br>гуанидина методом спектрофотометрии в ультрафиолетовой области .....                       | 68 |
| 4.3.1. Валидация методик количественного определения<br><i>N</i> -[2-[4-оксо-3(4 <i>H</i> )-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом<br>спектрофотометрии в ультрафиолетовой области..... | 72 |
| Заключение по главе 4 .....   | 77 |
| ГЛАВА 5. ПРИМЕНЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ<br>ДЛЯ АНАЛИЗА <i>N</i> -[2-[4-ОКСО-3(4 <i>H</i> )-ХИНАЗОЛИНИЛ]ПРОПИОНИЛ]-<br>ГУАНИДИНА.....   | 78 |
| 5.1. Определение <i>N</i> -[2-[4-оксо-3(4 <i>H</i> )-хиназолинил]пропионил]-гуанидина<br>методом капиллярного электрофореза.....  | 78 |

|   |            |
|---|------------|
| 5.1.1. Валидационная оценка пригодности разработанной методики определения <i>N</i> -[2-[4-оксо-3(4 <i>H</i> )-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом капиллярного электрофореза..... | 82         |
| 5.2. Разработка и валидация методики определения родственных примесей <i>N</i> -[2-[4-оксо-3(4 <i>H</i> )-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом капиллярного электрофореза .....     | 84         |
| 5.3. Определение <i>N</i> -[2-[4-оксо-3(4 <i>H</i> )-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии .....  | 90         |
| 5.3.1. Валидационная оценка пригодности разработанной методики определения биологически активного соединения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.....                    | 94         |
| 5.4. Определение родственных примесей <i>N</i> -[2-[4-оксо-3(4 <i>H</i> )-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.....                      | 97         |
| 5.5. Определение остаточных органических растворителей в субстанции <i>N</i> -[2-[4-оксо-3(4 <i>H</i> )-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом газовой хроматографии.....             | 101        |
| 5.5.1. Валидационная оценка пригодности разработанной методики определения остаточных количеств органических растворителей методом газовой хроматографии.....                           | 103        |
| Заключение по главе 5 .....   | 108        |
| <b>ГЛАВА 6. ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ И УСТАНОВЛЕНИЕ СРОКА ГОДНОСТИ <i>N</i>-[2-[4-ОКСО-3(4<i>H</i>)-ХИНАЗОЛИНИЛ]ПРОПИОНИЛ]-ГУАНИДИНА.....</b>  | <b>110</b> |
| 6.1. Прогнозирование процессов деградации и расчет термодинамических характеристик <i>N</i> -[2-[4-оксо-3(4 <i>H</i> )-хиназолинил]пропионил]-гуанидина .....                           | 110        |
| 6.2. Изучение продуктов деградации <i>N</i> -[2-[4-оксо-3(4 <i>H</i> )-хиназолинил]пропионил]-гуанидина.....  | 115        |

|  |     |
|--|-----|
| 6.3. Идентификация продуктов деструкции <i>N</i> -[2-[4-оксо-3(4 <i>H</i> )-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии..... | 118 |
| 6.4. Установление срока годности методом ускоренных испытаний <i>N</i> -[2-[4-оксо-3(4 <i>H</i> )-хиназолинил]пропионил]-гуанидина.....                              | 120 |
| 6.5. Долгосрочные испытания стабильности <i>N</i> -[2-[4-оксо-3(4 <i>H</i> )-хиназолинил]пропионил]-гуанидина .....  | 124 |
| Заключение по главе 6 .....  | 124 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....   | 126 |
| ОБЩИЕ ВЫВОДЫ .....   | 127 |
| ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....   | 129 |
| ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ .....   | 130 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....  | 131 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....   | 132 |
| Приложение А .....   | 147 |
| Приложение Б .....   | 153 |
| Приложение В.....  | 154 |
| Приложение Г .....   | 155 |
| Приложение Д.....  | 157 |
| Приложение Е .....   | 158 |
| Приложение Ж.....  | 159 |

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Патологии сердечно-сосудистой системы (ССС) являются одной из главных причин смертности населения. Защита миокарда различными фармакологическими средствами – неотъемлемая составляющая лечения заболеваний ССС [16,53,100].

Одной из таких групп, повышающей адаптацию сердечной мышцы к ишемии и реперфузии, является группа ингибиторов  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обменника изоформы NHE-1 [26].

Изучив данные литературных источников о доклинических и клинических испытаниях, можно сделать вывод, что NHE-1 – важная фармакологическая мишень [25,89,110]. Для снижения последствий ишемического и реперфузионного стресса группа препаратов ингибиторов  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обменника является перспективной и гарантирует внедрение нового класса кардиопротекторов в медицинскую практику [33].

С этой целью на кафедре фармацевтической и токсикологической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации было синтезировано биологически активное соединение (БАС) – производное хиназолина: *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидин (VMA-13-15) [69].

Проведение доклинических испытаний показало возможность его использования в качестве кардиопротекторного и нейропротекторного средства, превышающего по своей эффективности зарубежный препарат Зонипорид [15].

Контроль качества и разработка современных, объективных методик фармацевтического анализа лекарственных средств является одним из базовых этапов его внедрения в производство. Однако для этого необходимо всестороннее исследование физико-химических характеристик лекарственного средства,

которые могут влиять на фармакокинетические и фармакодинамические свойства, а также позволят осуществить обоснование его норм качества.

### **Степень разработанности темы исследования**

*N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидин (VMA-13-15) – новое соединение, производное хиназолина, фармацевтический анализ и стандартизация по основным физическим, химическим и физико-химическим показателям до настоящего времени не проводилась.

### **Цель и задачи исследования**

Целью данной работы является обоснование показателей контроля качества нового биологически активного соединения, обладающего кардиопротективной активностью, *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина (VMA-13-15), для создания проекта фармакопейной статьи.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Изучить физико-химические характеристики *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина для установления показателей контроля качества с использованием современных методов фармацевтического анализа.

2. Изучить химические свойства и характер УФ- и ИК-спектров *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина с целью разработки методик установления подлинности.

3. Теоретически обосновать и разработать оптимальные условия определения количественного содержания *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина титриметрическим (кислотно-основное титрование) и УФ-спектрофотометрическими методами.

4. Определить хроматографическую подвижность, теоретически обосновать и разработать оптимальные условия идентификации и определения количественного содержания *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом капиллярного электрофореза. Провести валидационную оценку разработанной методики.

5. Теоретически обосновать и разработать оптимальные условия идентификации и количественного определения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-

хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Провести валидационную оценку разработанной методики.

6. Разработать методики идентификации родственных примесей и примесей остаточных органических растворителей, провести валидацию методик их количественного определения.

7. Изучить стабильность *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина с использованием стрессовых, долгосрочных и ускоренных испытаний для установления его предварительного срока годности.

8. На основании изученных химических свойств и физико-химических характеристик *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина установить показатели контроля качества и подготовить проект фармакопейной статьи на субстанцию.

#### **Научная новизна**

Впервые проведено химико-фармацевтическое изучение нового биологически активного соединения – *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина (VMA-13-15). Определены его физические, физико-химические и химические свойства, а также спектральные характеристики. Разработаны методики определения подлинности *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методами ИК-спектрометрии и УФ-спектрофотометрии, а также с помощью химических реакций. Обоснована возможность использования и подобраны оптимальные условия для количественного определения содержания (VMA-13-15) титриметрическими, оптическими и хроматографическими методами. Разработаны методики идентификации и количественного определения примеси незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она. Проведена идентификация остаточных органических растворителей в фармацевтической субстанции *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом газовой хроматографии. Определена стабильность и установлены предварительные сроки годности VMA-13-15. Разработан проект нормативной документации на фармацевтическую субстанцию *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина.

## **Теоретическая и практическая значимость работы**

Проведенные исследования позволили обосновать показатели контроля качества VMA-13-15 с помощью современных методов анализа, которые легли в основу разработанного проекта нормативной документации. Полученные данные могут служить теоретической базой для разработки методик анализа других производных хиназолина.

## **Методология и методы исследования**

Методология проведенных исследований основана на изучении и обобщении зарубежных и отечественных литературных данных в области фармацевтического анализа производных хиназолина и гуанидина. В ходе исследования были использованы физико-химические методы анализа: ИК-спектроскопия, УФ-спектрофотометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография, газовая хроматография, капиллярный электрофорез. Все результаты, полученные в ходе экспериментальной работы, были статистически обработаны, методики количественного определения валидированы с учетом требований ГФ РФ 14 издания и ГФ РФ 15 издания, а также методических рекомендаций по валидации аналитических методик.

## **Личный вклад автора**

Автором были лично осуществлены все этапы экспериментальных исследований: выбор и обоснование темы диссертации, разработаны цели и задачи работы, проведен поиск и анализ отечественной и зарубежной литературы по теме исследования, составлен план экспериментальной работы. Установлены основные показатели качества *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина: «Температура плавления», «Растворимость», «Потеря в массе при высушивании», «Сульфатная зола», «Тяжелые металлы». Для подтверждения подлинности исследуемой субстанции автором были получены ИК-спектры и установлены характерные полосы поглощения основных функциональных групп, УФ-спектры, а также выбраны химические реакции, подтверждающие наличие функциональных групп и структурных фрагментов *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина. Автором были научно обоснованы,

разработаны и валидированы методики количественного анализа нового биологически активного соединения – *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методами УФ-спектрофотометрии, ВЭЖХ, капиллярного электрофореза, а также методом неводного титрования. Установлено содержание остаточных органических растворителей методом ГХ.

Автором были разработаны методики идентификации и количественного определения примеси незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она методами ВЭЖХ и капиллярного электрофореза. Проведено комплексное изучение стабильности методами стрессовых, ускоренных и долгосрочных испытаний и установление предварительных сроков годности *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина. Автор самостоятельно провел статистическую обработку полученных данных, составил проект нормативной документации на субстанцию *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина. Диссертация и автореферат были подготовлены автором лично.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Результаты изучения химических и физико-химических свойств *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина с целью выбора химических реакций и физико-химических методов для его идентификации.

2. Результаты разработки и валидации методик количественного определения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина при использовании кислотно-основного титрования, методов капиллярного электрофореза, УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ.

3. Результаты разработки и валидации методики идентификации и количественного определения родственной примеси *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методами капиллярного электрофореза и ВЭЖХ.

4. Результаты определения остаточных растворителей методом ГХ.

5. Результаты теоретического исследования с помощью компьютерных технологий процесса деградации *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина.

6. Результаты по установлению сроков годности, обоснованные методами стрессовых, ускоренных и долгосрочных испытаний стабильности *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина.

7. Показатели контроля качества фармацевтической субстанции *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Научные положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия конкретно пункту 2 и 3 научной специальности.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Степень достоверности полученных данных достигнута применением современных методов фармацевтического анализа, таких как инфракрасная спектromетрия, спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой области, ВЭЖХ, капиллярного электрофореза, газовой хроматографии, а также изучением и применением в качестве теоретической базы трудов зарубежных и отечественных ученых. Обработка результатов проводилась с помощью методов математической статистики и валидационной оценки с соблюдением требований ГФ РФ 14 издания и ГФ РФ 15 издания.

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на всероссийских научно-практических конференциях с международным участием «Беликовские чтения» (Пятигорск 2018, 2021); научно-практической конференции «Синтез и анализ лекарственных средств синтетического и растительного происхождения» (Пятигорск, 2017); международной научно-практической конференции «Проблемы и перспективы в международном трансфере инновационных технологий» (Уфа, 2018).

Апробация работы состоялась на расширенном заседании кафедры фармацевтической химии совместно с проблемной комиссией Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения

Российской Федерации, протокол № 4 от 06.10.2023.

### **Внедрение результатов в практику**

Разработанные методики *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина нашли практическое применение и используются в аналитической группе отдела синтеза и фармацевтических технологий Научного центра инновационных лекарственных средств федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Акт о внедрении от 20.04.2022).

Результаты исследования по теме диссертационной работы использованы при разработке учебно-методического информационного комплекса для аспирантов Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по дисциплине «Фармацевтическая химия и фармакогнозия» (Акт о внедрении от 07.07.2021).

### **Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук**

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научных исследований Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по проблеме «Изыскание и изучение новых лекарственных средств».

### **Публикации по теме диссертации**

По результатам исследования опубликовано 9 работ, в том числе 4 научные статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 2 научные статьи в изданиях,

индексируемых в международной базе RSCI; иные публикации по результатам диссертационного исследования – 3.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа изложена на 165 страницах машинописного текста, содержит 57 таблиц, 36 рисунков, 7 схем. Работа состоит из введения, обзора литературы, главы «Объекты и методы исследования», глав экспериментальной части, заключения, общих выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложений. Список литературы включает 120 источников, в том числе 20 – на английском языке.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Краткая характеристика лекарственных средств кардиопротекторного действия

Кардиопротекторы – группа лекарственных препаратов, действие которых направлено на поддержание оптимальной функции сердечной мышцы в условиях истощения или патологического процесса. Концепция применения средств кардиопротекторного действия введена в практическую медицину с 1950-х годов и неоднократно пересматривалась [33,96,102,114]. Первоначально кардиопротекторы позиционировались как средства улучшающие функции сердца в условиях, как физиологической нормы, так и в условиях патологии, что подразумевало наличие только цитопротективного действия. На сегодняшний день понятие кардиопротекции и, соответственно, кардиопротекторов расширено [40,103,108]. Так, арсенал кардиопротекторов представлен не только «классическими» цитопротекторами, но и соединениями с поливалентным механизмом действия, включая препараты метаболического действия, эффект которых направлен на нормализацию реакций электронного транспорта в дыхательной цепи митохондрий и оптимизацию синтеза макроэргов, а также антиоксидантов, восстанавливающих проантиоксидантное равновесие в кардиомиоцитах [13,116]. На настоящий момент не существует единой общепринятой классификации лекарственных препаратов кардиопротекторного действия, но, основываясь на работах Johan De Sutter и Л.М. Гуниной, можно выделить кардиопротекторы прямого и непрямого действия (*приложение А*) [20,106].

Влияние прямых кардиопротекторных препаратов объясняется их локальным (усиление прочности клеточных мембран, положительное воздействие на метаболические процессы в мышечных клетках сердца, вазодилатирующее действие) и общим влиянием на системы организма (нормализация тонуса сосудов через воздействие на ЦНС). Непрямые кардиопротекторы снижают нагрузку на сердце, что положительным образом сказывается на работе миокарда

[99,109]. Группы данных препаратов приведены в *приложении А*. Однако препараты этой группы, в большинстве своем, нарушают функции почек, приводят к головокружению, арганулоцитозу и т.д.

В связи с этим, несмотря на наличие уже известных эффективных кардиопротекторов, поиск новых соединений с улучшенной биофармацевтической заданной кардиопротективной активностью является перспективным для медицинской и фармацевтической науки [111].

В настоящее время актуальным направлением является поиск и исследование потенциальных цитопротекторов, защищающих клетки от ишемического и реперфузионного повреждения. При анализе химической структуры выявлено, что большинство из них содержат гуанидиновую группу. Как указывает ряд авторов, в экспериментальных условиях производные гуанидина значительно улучшают сократительную способность миокарда, устраняют ацидоз и подавляют аритмогенез за счет блокады  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обменника [66,97].

Ингибиторы NHE-1 найдены среди производных пиразина (амилорид, DMA, EIPA, MIBA); бензоилгуанидинов (НОЕ-642, НОЕ-694, EMD-96785); моноциклических производных гуанидина – производных метакрилоилгуанидина (S1611, S3226); бициклических производных гуанидина: производных индолоилгуанидина (SM-20220) и хинолина (зонипорид) [25] и аминокбензимидазолов [21,39,72,115].

В Волгоградском государственном медицинском университете (ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России) было синтезировано новое БАС – производное хиназолин-4(3*H*)-она: *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидин (VMA-13-15) (рисунок 1).

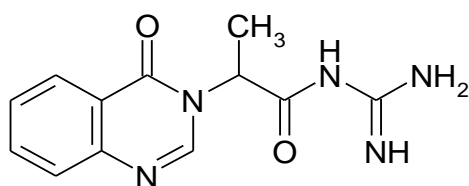


Рисунок 1 – Структурная формула *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

Синтез VMA-13-15 был осуществлен в НИИ фармакологии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России под руководством профессора А.А. Озерова путем аминирования сложного эфира 2-[хиназолин-3(4*H*)-ил] пропионовой кислоты, содержащего заместители в положении 4 хиназолин-4(3*H*)-она, гуанидином-основанием, получаемым *in situ* из соответствующего гидрохлорида в среде безводного метилового спирта в присутствии калия гидроксида [69].

Методика синтеза лабораторного образца: 2,00 г (13,7 ммоль) хиназолин-4(3*H*)-она и 4,00 г (28,9 ммоль) безводного карбоната калия перемешивают в 40 мл безводного диметилформамида при температуре 80-85°C в течение 15 мин, добавляют раствор 3,25 г (14,2 ммоль) бензилового эфира бромуксусной кислоты в 10 мл диметилформамида и перемешивают при той же температуре 1 ч. [9]. Реакционную массу охлаждают, фильтруют, фильтрат упаривают на ротационном испарителе при остаточном давлении 10 мм рт.ст. при температуре бани 90-95°C, остаток охлаждают, растирают с 25 мл воды, фильтруют, промывают на фильтре 2 раза по 10 мл холодной воды, сушат на воздухе в течение суток и кристаллизуют из 50 мл изопропилового спирта. Получают 3,30 г (82%) светло-желтого кристаллического вещества. Далее к раствору добавляют 3,0 г (30,4 ммоль) гуанидина гидрохлорида, нагревают до кипения, добавляют в течение 5 минут порциями 2,0 г (32,1 ммоль) гранулированного твердого калия гидроксида и кипятят 15 мин. Затем горячий раствор фильтруют, отделяя образовавшийся калия хлорид, фильтрат охлаждают до комнатной температуры, выдерживают в холодильнике в течение суток, образовавшийся осадок отфильтровывают, промывают 10 мл холодного метанола и 10 мл диэтилового эфира, сушат на воздухе и получают 4,35 г белого аморфного вещества [15] (схема 1).

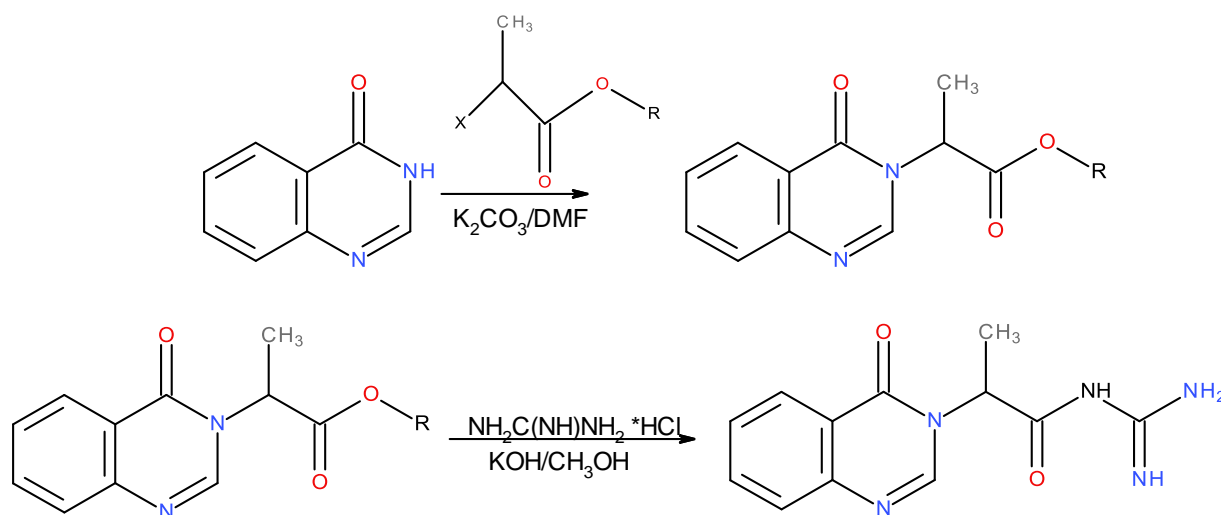


Схема 1 – Синтез *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

Структура полученного соединения подтверждена авторами с помощью спектра ПМР, снятом в ДМСО- $d_6$ ,  $\delta$ , м.д.: 1,57 д (3H, 8 Гц,  $CH_3$ ); 5,17 кв (1H, 4 Гц, CH); 7,50 т (1H, 8 Гц,  $H^6$ ); 7,61 уш.с (4H,NH); 7,66 д (1H,8 Гц,  $H^8$ ); 7,80 т (8 Гц, 1H,  $H^7$ ); 8,13 д (1H, 8 Гц,  $H^5$ ); 8,29 с (1H,  $H^2$ ) (*приложение Б*).

Изучение фармакологической активности соединения VMA-13-15 проводилось под руководством академика В.И. Петрова и руководителя отдела экспериментальной фармакологии и токсикологии член.-корр. И.Н. Тюренкова.

Изучение влияния соединений на активность  $Na^+/H^+$ -обменника проведено *in vitro* на тромбоцитах кролика. Доклинические исследования показали выраженную способность соединения угнетать натрий-водородный обмен, превосходящий по своему действию препарат сравнения Зонипорид [15].

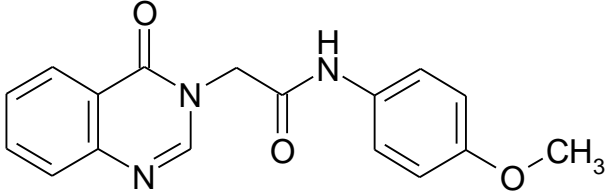
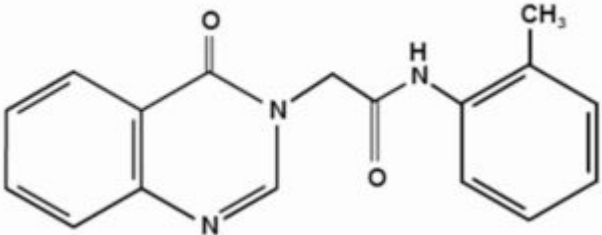
Проведенные исследования на токсичность (*приложение В*) показали, что соединение является малотоксичным.

Так как изучаемое БАС содержит в своей структуре фрагменты как хиназолина, так и гуанидина, представляет интерес провести анализ используемых химических и физико-химических методов для идентификации как БАС, так и лекарственных средств, имеющих в своей структуре как фрагменты азотсодержащих гетероциклов, так и фрагменты гуанидина.

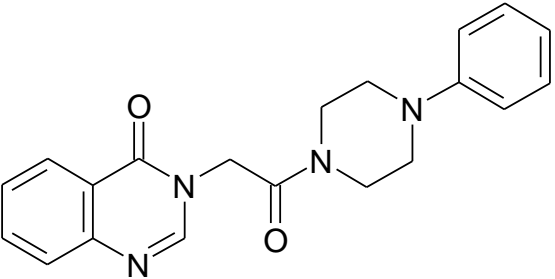
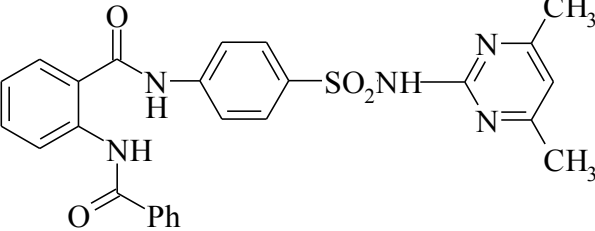
## **1.2. Методы анализа биологически активных соединений производных хиназолина**

На базе Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала Волгоградского государственного медицинского университета на протяжении последних 5 лет ведется разработка методик анализа и стандартизации производных хиназолина, обладающих различной фармакологической активностью (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристики биологически активных соединений, производных хиназолина

| Структурная формула, химическое название   | Физические свойства   | Фармакологическая активность                          | Литература  |
|--|---|---|-------------|
| 1  | 2   | 3   | 4           |
|  <p>3-[2-(4-метоксифениламино)-2-оксоэтил]хиназолин-4(3<i>H</i>)-он<br/>(VMA-10-18)</p> | <p>Кристаллический порошок от белого до светло-желтого цвета, без запаха; Легко растворим в ДМСО, ДМФА и муравьиной кислоте. Умеренно растворим в спирте этиловом 96%, практически нерастворим в воде очищенной; Т<sub>пл.</sub> 230 до 231°C</p> | <p>анксиолитическая, антидепрессивная, ноотропная</p> | <p>[58]</p> |
|  <p>3-[2-(2-Метилфениламино)-2-оксоэтил]-хиназолин-4(3<i>H</i>)-он<br/>(VMA-10-13)</p> | <p>Аморфный порошок белого цвета с розоватым оттенком, со слабым характерным запахом; Мало растворим в спирте этиловом 96%, очень мало растворим в воде очищенной, практически нерастворим в хлороформе; Т<sub>пл.</sub> 257 до 261°C [9]</p>     | <p>ноотропная, противогипоксическая</p>               | <p>[9]</p>  |

## Продолжение Таблицы 1

|   |   |   |               |
|---|---|---|---------------|
|  <p>3-[2-(4-фенил-1-пиперазино)-2-оксоэтил]-<br/>хиназолин-4(3<i>H</i>)-он<br/>(VMA-10-21)</p>   | <p>Игольчатые кристаллы кремового цвета, без запаха;<br/>Трудно растворим в воде очищенной, растворим ДМСО, ДМФА, легко растворим в муравьиной и уксусной кислотах, очень мало растворим в ацетоне;<br/>Т<sub>пл.</sub> 222 до 224°C [14]</p> | <p>антидепрессантная<br/>анксиолитическая</p>                       | <p>и [14]</p> |
|  <p>2-бензилоамино-N-[4-(4,6-диметилпиримидин-2-илсульфамойл)-фенил]-бензамид<br/>(ПМФИ-195)</p> | <p>Белый кристаллический порошок;<br/>Легко растворим в ацетоне, хлороформе, практически нерастворим в спирте этиловом 95% и воде очищенной;<br/>Т<sub>пл.</sub> 212-213°C</p>  | <p>анксиолитическая,<br/>актопротекторная,<br/>антидепрессивная</p> | <p>[29]</p>   |

### 1.2.1. Методы идентификации производных хиназолина

Анализ литературных источников позволил выделить основные селективные и неселективные методы физического, химического и физико-химического анализа, используемые при подтверждении подлинности БАС или лекарственных средств, производных хиназолина, различающихся по чувствительности, информативности, пробоподготовке и доступности [54].

В связи с тем, что исследуемые соединения содержат в своей структуре третичную аминогруппу, они могут взаимодействовать с общеалкалоидными реактивами и образовывать соответствующие осадки, а также с так называемыми «специальными» реактивами давать характерное окрашивание. Так, для идентификации соединения ПМФИ-195 авторы разработали методики экспресс-реакций с такими реактивами как Марки, Фреде, Манделина и Эрдмана. Все реакции показали высокую специфичность окраски [37].

Д.С. Волокитиной для подтверждения подлинности 3-[2-(2-метилфениламино)-2-оксоэтил]-хиназолин-4(3H)-она в проект фармакопейной статьи предложена наиболее чувствительная реакция с реактивом Манделина [90].

Кроме того, для подтверждения подлинности исследуемых БАС описано также использование как спектроскопических, так и хроматографических методов анализа.

Для идентификации соединений, описанных выше (таблица 1), используют ИК-спектры, зарегистрированные в области частот от 4000 до 400 см<sup>-1</sup> в диске с калия бромидом [10]. Обнаружены характерные полосы поглощения для пиримидинового цикла, пик, характерный для группы –C=N, и деформационные колебания связи –СН. А также сильная интенсивная полоса валентных колебаний, характерная для вторичной аминогруппы бензольного кольца [61].

Д.С. Волокитина при определении подлинности VMA-10-13 использовала также и метод УФ-спектрофотометрии: 0,001% раствор субстанции БАС в спирте этиловом 96% должен иметь максимумы поглощения при 226 ± 2 нм, 265 ± 2 нм,

302 ± 2 нм и 313 ± 2 нм [7]. При анализе 0,005% спиртового раствора субстанции 3-[2-(4-метоксифениламино)-2-оксоэтил]хиназолин-4(3H)-она Е.С. Мищенко с соавторами методом спектрофотометрии установила, что УФ-спектр раствора имеет характерные максимумы поглощения 231 нм ± 2 нм и 259 ± 2 нм [59].

Для идентификации БАС 2-бензилоамино-N-[4-(4,6-диметилпиримидин-2-илсульфамоил)-фенил]-бензамида Н.О. Коваль предложила использовать метод хроматографии в тонком слое сорбента восходящим методом на пластинках «Sorbfil» в системе растворителей н-бутанол-уксусная кислота ледяная-вода (4:1:2). После детектирования УФ-светом и парами йода обнаруживали характерные зоны адсорбции [85].

Таким образом, для создания проектов НД для новых БАС, проявивших высокую биологическую активность, авторы предлагают использовать для идентификации характерные ИК- и УФ-спектры, метод ТСХ и химические реакции, подтверждающие наличие третичной аминогруппы.

### **1.2.2. Методы количественного определения производных хиназолина**

Изучение литературы показало, что для количественного определения производных хиназолина используются методы как химические, так физико-химические, которые основаны на реакционной способности функциональных групп и структурных фрагментов изучаемых соединений.

Ввиду наличия третичной аминогруппы все изучаемые БАС и проявляют основные свойства, в связи с чем для их количественного определения можно использовать метод титрования в неводных средах.

Б.В. Боровский с соавторами разработали методику количественного определения нового производного хиназолинона в системе растворителей уксусная кислота ледяная – муравьиная кислота (10:10) с использованием индикатора кристаллического фиолетового. Относительная погрешность метода составила 2,21% [83]. Также предложено определение количественного содержания нового биологически активного соединения антидепрессивного

действия 3-[2-(4-фенил-1-пиперазино)-2-оксоэтил]-хиназолин-4(3H)-она методом потенциометрического титрования в неводной среде, при использовании в качестве титранта хлорной кислоты раствор. Проведена валидационная оценка по показателям прецизионность, правильность и линейность [77]. Метод кислотно-основного титрования в неводных растворителях использовала в своей работе и Д.С. Волокитина для определения количественного содержания основного вещества в субстанции VMA-10-13. В качестве растворителя выбрана смесь муравьиной кислоты и уксусного ангидрида. Конечную точку титрования определяли потенциометрически [8,9]. В своих работах Е.С. Мищенко также предлагает для количественного определения субстанции титриметрический метод неводного титрования с хлорной кислоты раствором, с фиксацией точки эквивалентности с помощью индикатора [58].

Т.А. Гендугов с соавторами для количественного определения нового биологически активного соединения антидепрессивного действия 3-[2-(4-фенил-1-пиперазино)-2-оксоэтил]-хиназолин-4(3H)-она разработали методику спектрофотометрического определения в ультрафиолетовой области с максимумом поглощения 275 нм [81].

В качестве альтернативной методики Д.С. Волокитина для 3-[2-(2-метилфениламино)-2-оксоэтил]-хиназолин-4(3H)-она также предлагает использовать спектрофотометрию в ультрафиолетовой области. Оптическую плотность спиртового раствора субстанции измеряют при длине волны 265 нм [82,9].

Метод ВЭЖХ Д.С. Волокитиной был использован для количественного определения VMA-10-13. В качестве подвижной фазы предложена смесь ацетонитрил-фосфорная кислота 0,05 М (80:20), время хроматографирования составило 20 минут, детектор спектрофотометрический при 226 нм. Расчет содержания проводили по площади пика раствора стандартного образца [75].

### 1.2.3. Методы установления родственных примесей

Для установления родственных примесей в БАС производных хиназолина описаны хроматографические методы анализа. При анализе 3-[2-(2-метилфениламино)-2-оксоэтил]-хиназолин-4(3*H*)-она с использованием тонкослойной хроматографии изучали хроматографическую подвижность вещества в различных растворителях. Детектирование проводили различными способами: с помощью УФ-света и цветореагентов-реактива Драгендорфа и паров йода. Наиболее оптимальной подвижной фазой является этилацетат, проявитель УФ-свет, которые позволяют разделить и идентифицировать предполагаемые родственные примеси [60].

Метод ВЭЖХ использовался в работах Е.С. Мищенко и Д.С. Волокитиной для определения примеси исходного незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она. Испытания проводили в следующих условиях: подвижная фаза – ацетонитрил-фосфорная кислота, время регистрации хроматограмм – около 20 минут. Установлено, что содержание примеси не превышает 0,1% [57,80].

В качестве остаточных органических растворителей методом ГХ установлено предельное содержание диметилформамида – не более 0,088% для субстанции 3-[2-(2-Метилфениламино)-2-оксоэтил]-хиназолин-4(3*H*)-она [9]. В БАС ПМФИ-195 обнаружены уксусная кислота ( $34,59 \pm 1,02$  мг) в пересчете на 1 г субстанции и диметилформамид  $38,99 \pm 1,70$  мг. Расчет содержания остаточных растворителей в субстанции проводили с учетом площади пика соответствующего раствора стандартного образца [61,38].

В связи с тем, что исследованный литературный обзор по анализу производных хиназолина был проведен нами только по биологически активным соединениям, а не лекарственным средствам, мы провели обзор фармакопейных статей, представленных в Государственной фармакопее РФ 14 издания, на фармацевтические субстанции, имеющие в своей структуре ядро гетероцикла.

Анализ фармакопейных статей, включенных в Государственную фармакопею 14 издания, на фармацевтические субстанции, содержащие в своей

структуре азотсодержащие гетероциклы, такие как пиррол, пиразол, имидазол, пиридин, пиперазин, пиримидин и конденсированные с ним циклы, показал, что, как правило, для анализа этих субстанций используются физико-химические методы [17].

Так, для идентификации субстанций обязательно сравнивается ИК-спектр с аналогичным спектром стандартного образца (нифедипин). Чаще всего должно также проводиться сравнение УФ-спектров поглощения исследуемых субстанций со спектрами поглощения стандартных образцов, измеренных в тех же условиях (амлодипин). Рекомендуется также обнаружение конкретных максимумов и минимумов в измеренных УФ-спектрах, характерных для анализируемой субстанции (доксазозин), либо расчет удельного показателя поглощения (пиразинамид). Иногда дается аналогичная сравнительная оценка хроматограмм, полученных методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (бетагистинадигидрохлорид). Часто также рекомендуется проводить одну специфическую химическую реакцию (например, для обнаружения кислот хлористоводородной или серной и т.д.) (деквалиния хлорид). Кроме того, приводятся и некоторые специфические реакции обнаружения структурных фрагментов молекулы (бензилникотинат) [17].

Обязательным для каждой субстанции является определение родственных примесей. С этой целью предложено в основном использовать метод ВЭЖХ (омепразол и т.д.), или иногда -ТСХ (дроперидол). Остаточные органические растворители рекомендуется определять методом газовой хроматографии (дротаверина гидрохлорид).

Для количественного определения фармацевтических субстанций, содержащих в своей структуре азотсодержащие гетероциклы, в основном предложен метод неводного титрования, как по типу слабых оснований, так и по типу слабых кислот при наличии в молекуле субстанции функциональных групп, способных проявлять слабокислые свойства (итраконазол). Для количественного определения субстанций в лекарственных препаратах используется как метод ВЭЖХ (левофлаксацин и др.), так и спектрофотометрический метод [17].

### 1.3. Методы анализа лекарственных средств производных гуанидина

#### 1.3.1. Физико-химические свойства и методы идентификации производных гуанидина

Анализ нормативной документации позволил выделить лекарственные средства из группы гуанидина с различной фармакологической активностью. Для изучения методов идентификации и количественного определения производных гуанидина был осуществлен обзор отечественной и зарубежной литературы, касающийся анализа физико-химических свойств, методов качественного и количественного определения.

Гуанидин – бесцветное кристаллическое гигроскопическое вещество (рисунок 2). Является сильным органическим основанием ( $pK_a=13,6$ ), производное которого образует макроэргическую связь [110]. Встречается в качестве структурного фрагмента в нуклеиновых кислотах, аргинине, фолиевой кислоте, стрептомицине.

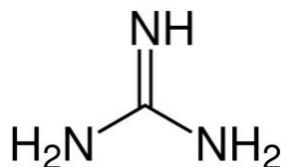
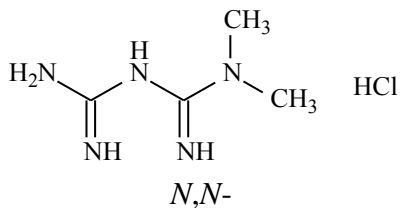
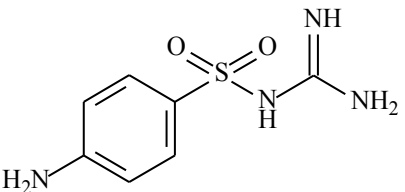


Рисунок 2 – Структурная формула гуанидина

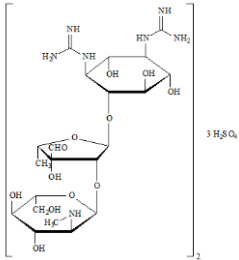
Соли гуанидина обычно представляют собой белые кристаллические вещества, легко растворимые в воде.

В зависимости от числа атомов азота, находящихся в гуанидиновом фрагменте, производные гуанидина можно разделить на две группы: полные гуанидины (в гуанидиновом фрагменте присутствуют все три атома азота) и неполные гуанидины (один из атомов азота гуанидинового фрагмента заменен другим гетероатомом, например кислородом или серой) (таблица 2) [49].

Таблица 2 – Характеристики лекарственных средств, производных гуанидина

| Формула и химическое название<br>Фармакологическое действие   | Идентификация  | Количественное определение  | Родственные примеси  |
|---|--|---|--|
| 1   | 2  | 3   | 4  |
| <p>Метформина гидрохлорид<br/>ФС.2.1.0137.18<br/>Гипогликемическое средство</p>  <p>Диметилимидодикарбоимиддиамида<br/>Гидрохлорид</p> | <p>1. <i>ИК-спектр.</i> Должен соответствовать спектру СО метформинагидрохлорида.<br/>2. <i>Качественная реакция.</i> Характерная реакция на хлориды.</p>  | <p>Ацидиметрия в неводных растворителях. Конечную точку титрования определяют потенциометрически.</p>   | <p>Методом ВЭЖХ определяют допустимое содержание примесей N-цианогуанидина, меламина и диметиламина.</p>                         |
| <p>Сульфагуанидин<br/>ФС.2.1.0179.18<br/>Противомикробное средство</p>  <p>N-(4-Аминобензолсульфонил)гуанидин</p>                     | <p>1. <i>ИК-спектр.</i> Должен соответствовать спектру СО сульфагуанидина.<br/>2. <i>Тонкослойная хроматография.</i> Основная зона адсорбции на хроматограмме испытуемого раствора по положению, интенсивности поглощения и величине должна соответствовать основной зоне адсорбции раствора СО сульфагуанидина.<br/>3. <i>Качественная реакция.</i> Реакция на первичные ароматические амины.<br/>4. <i>Качественная реакция.</i> Образование плава фиолетово-красного цвета с запахом аммиака.</p> | <p>Нитритометрия, с использованием внутренних индикаторов тропеолин ОО в смеси с метиленовым синим.</p> | <p>Методом ТСХ. Определяют допустимое содержание примесей (исходных продуктов или продуктов деструкции бензолсульфокислоты).</p> |

## Продолжение Таблицы 2

|   |   |   |  |
|---|---|---|--|
| <p>Стрептомицина сульфат<br/>ФС.2.1.0037.15<br/>Антибактериальное средство</p>  <p><i>N,N'</i>-Бис(аминоиминометил)-[<i>O</i>-2-дезоксидеокси-2-(метиламино)-<math>\alpha</math>-<i>L</i>-глюкопиранозил-(1→2)-<i>O</i>-5-дезоксидеокси-3-<i>C</i>-формил-<math>\alpha</math>-<i>L</i>-ликсофуранозил-(1→4)-<i>D</i>-стрептамина сульфат (2:3)</p> | <p>1. <i>Тонкослойная хроматография.</i> Основное пятно на хроматограмме испытуемого раствора должно находиться на уровне пятна <math>\text{CO}</math> раствора стрептомицина сульфата.</p> <p>2. <i>Качественная реакция.</i> С 1% раствором железа(III) хлорида; раствор должен окраситься в фиолетовый цвет.</p> | <p>Проводят определение в соответствии с ОФС «Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар».</p> | <p>Определяют методом ТСХ. допустимое содержание примеси стрептомицина В. Пятно, соответствующее стрептомицину В на хроматограмме испытуемого раствора, не должно по величине и интенсивности окраски превышать пятно раствора <math>\text{CO}</math> (не более 3%).</p> |
|   | <p>3. <i>Качественная реакция.</i> С раствором <math>\alpha</math>-нафтола и 2 мл 1,5% раствора натрия гипохлорита; наблюдается красное окрашивание.</p> <p>4. <i>Качественная реакция.</i> Субстанция дает характерную реакцию на сульфаты.</p>  |   |  |

Как следует из данных таблицы 2, для идентификации остатка гуанидина в стрептомицине используются реакции с хлоридом железа, с  $\alpha$ -нафтолом и гипобромитом натрия в щелочной среде (реакция Сакагучи) (рисунок 3), аналитический эффект которой – появление красного окрашивания:

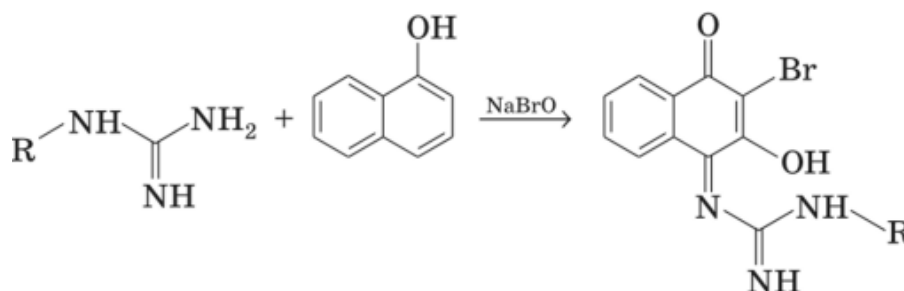


Рисунок 3 – Реакция Сакагучи

Для определения подлинности фармацевтических субстанций, производных гуанидина (метформина гидрохлорида, сульфогуанидина) также используется метод ИК-спектроскопии (таблица 2), в основном измерения проводят в области от  $4000\text{ см}^{-1}$  до  $400\text{ см}^{-1}$ . Основным преимуществом ИК-спектрометрии является относительная простота интерпретации результатов анализа [87].

Кроме того, в ГФ РФ 14 издания описаны методики идентификации с использованием метода ТСХ (сульфагуанадин, стрептомицин). Подлинность устанавливают по наличию характерных пятен на хроматограммах испытуемых образцов.

Количественное содержание устанавливают титриметрическими методами. Выбор метода зависит от структурных особенностей исследуемых субстанций. Как следует из таблицы, используемые химические методы базируются в основном на определении характерных функциональных групп, не относящихся к гуанидину.

При определении допустимого содержания примесей используют методы ВЭЖХ и ТСХ. Идентификацию примесей проводят по временам удерживания, либо по наличию характерных пятен на хроматограммах.

Исходя из того, что в Государственной фармакопее РФ 14 издания найдено

только 3 фармацевтические субстанции, содержащих остаток гуанидина, нами также был осуществлен поиск методик идентификации и методов количественного анализа производных гуанидина, описанных в научной литературе.

Согласно литературным данным известно, что для идентификации гуанидина можно использовать следующие химические реакции.

Щелочной гидролиз гуанидиновых групп (схема 2) сопровождается выделением аммиака, который можно обнаружить по характерному запаху или посинению влажной красной лакмусовой бумажки [24]:

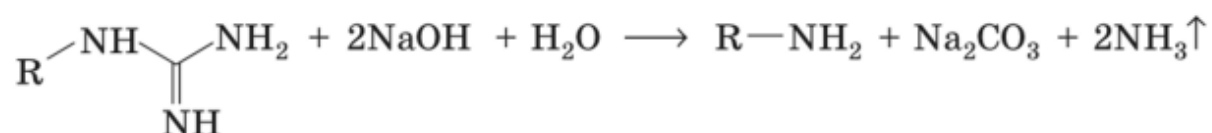


Схема 2 – Щелочной гидролиз гуанидиновых групп

Используется также возможность гуанидина образовывать характерный красно-коричневый осадок с реактивом Несслера.

При взаимодействии с различными хинонами производные гуанидина также образуют окрашенные продукты [24]. Для обнаружения гуанидина рекомендуют цветную реакцию с натриевой солью 1,2-нафтохинон-4-сульфо кислоты. Известно также, что для обнаружения гуанидина используют реакцию с раствором соды, раствором гипохлорита натрия и 0,3% водным раствором тимола. Появляется золотисто-желтая окраска [19].

Для идентификации гуанидина кроме цветных реакций используют и различные физико-химические методы.

Так, для мономерных и полимерных производных диаллилгуанидинацетата, акрилатгуанидина и метакрилатгуанидина Ю.А. Малкандуев и Н.А. Сивов с соавторами готовили спрессованные смеси таблеток исследуемых образцов с бромидом калия (1:200). Измеренные ИК-спектры имели характерные полосы при 3385 и 3100 см<sup>-1</sup>, которые относятся к валентным колебаниям N-H связей в

гуанидиновом катионе. Две интенсивные полосы  $1680$  и  $1656\text{ см}^{-1}$  связаны с  $\text{N}=\text{C}$  валентными колебаниями и смешанными с ними деформациями  $\text{NH}_2$  групп. Наблюдаются также и две полосы  $520$  и  $544\text{ см}^{-1}$ , относящиеся к угловым деформациям  $\text{CNH}$  [68].

Для определения подлинности фармацевтических субстанций, содержащих гуанидиновые фрагменты Государственная фармакопея США также рекомендует использование физико-химических методов ИК-спектроскопии и УФ-спектрофотометрии (Амилорида гидрохлорид) [119].

Прямой спектрофотометрический метод основан на наличии в молекулах хромофорных фрагментов (нитрогруппа— $\text{NO}_2$ , нитрозогруппа— $\text{N}=\text{O}$ , карбонильная группа  $>\text{C}=\text{O}$ , сопряженные системы двойных связей, хиноидные группировки и др.) [48]. Так, для испытания подлинности метформина при использовании метода УФ-спектрофотометрии водный раствор препарата должен иметь максимум поглощения в области  $233\text{ нм}$  [1]. Спектр раствора хлоргексидина диглюканата в области длин волн от  $220$  до  $320$  не должен иметь максимумы при  $231\text{ нм}$  и  $253\text{ нм}$  и минимум при  $242\text{ нм}$  [95].

Известны методики идентификации производных гуанидина методом ТСХ. Данный метод является одним из основных методов исследования лекарственных соединений, который не потерял своего значения за его простоту, наглядность и доступность по стоимости оборудования и реактивов [2].

При хроматографировании в системе растворителей *n*-бутанол-уксусная кислота-вода (12:3:2), при проявлении пятен щелочным водно-ацетоновым раствором красной кровяной соли и нитропруссиды натрия гуанидины окрашиваются в светло-вишневый цвет, что типично для гуанидиновой группы с заместителем у одного атома азота [91].

При определении подлинности метформина в таблетках используют метод ТСХ на пластинке, покрытой силикагелем в системе растворителей *n*-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода в соотношении 4:1:5. Сравнивают  $R_f$  испытуемого раствора метформина и стандартного образца [1].

### 1.3.2. Методы количественного определения производных гуанидина

Химические методы являются экономически обоснованными, не требуют дорогостоящего оборудования [41]. Наиболее широко применяют титриметрические методы.

Для количественного определения полимерных производных гуанидина в антисептических средствах коллективом ученых кафедры химии и технологии редких и рассеянных элементов МИТХТ им. М.В. Ломоносова, испытательной аналитической лаборатории ЗАО «МЕТТЭМ-Технологии» разработан метод двухфазного титрования в системе «вода-хлороформ» додецилсульфатом натрия [66]. И.В. Каранди, М.М. Бузланова предложили потенциометрическое определение производных гуанидина с тетрафенилборатом [32].

Д.О. Шаталовым предложен метод Кьельдаля для количественного определения азота олигогексаметиленгуанидин-гидрохлоридах (ОГМГ-ГХ). При проведении титрования в растворах низких концентраций использовали смешанный индикатор (метиленовый красный + метиленовый синий) [73].

В зарубежной литературе описан метод неводного титрования в среде уксусной кислоты ледяной и диоксана для количественного определения амилорида гидрохлорида [119].

Для количественного определения метформина описан метод УФ-спектрофотометрии. Расчет количественного содержания проводят, используя значение удельного показателя поглощения (782) [1]. Данный метод также рекомендуют использовать для расчета количественного содержания в лекарственных препаратах хлоргексидина диглюконата. Содержание вычисляют по формуле с учетом удельного показателя поглощения – 330 [95].

Кроме метода прямой спектрофотометрии для количественной оценки используют спектрофотометрические методы на основе цветных реакций. Известен способ количественного определения методом фотоэлектроколориметрии по химической реакции с щелочным раствором натрия нитропруссиды и водорода пероксида. Этот способ используется для

количественного определения лекарственных веществ в фармакопейных препаратах в заводских, контрольно-аналитических, в биохимических и судебно-химических лабораториях. Способ, разработанный учеными Воронежского государственного университета, является высокочувствительным, селективным и точным [69].

Известна методика фотометрического определения полигексаметиленгуанидина в виде комплекса с йодом [4,22], а также методики, основанные на образовании ассоциатов производных гуанидина с эозином [47], с бромфеноловым красным [98] и феноловым красным [97].

Н.А. Кравченя с соавторами описали возможность количественного определения гуанидина методом спектрофотометрии при длине волны 530 нм. Метод основан на реакции образования продукта ацилирования монозамещенных гуанидина в щелочной среде, который приобретает красное окрашивание (N-ацилирование карбоновыми кислотами в растворе серной кислоты). Количество гуанидина находят по калибровочным графикам, построенным на известных количествах как гуанидина, так и его производных. Ошибка определения составляет 6% [71].

Современная высокоэффективная жидкостная хроматография – один из эффективных методов разделения сложных смесей на отдельные компоненты и проведения качественного и количественного анализа компонентов разделяемой смеси [46].

Для количественного определения гуанидина A.D.Lucas, E.A.Gordon, M.E. Stratmeyer предложили использовать метод ВЭЖХ с предварительной твердофазной экстракцией [113]. E.M. Abad-Villar, S.F. Etter и др. разработали для этих целей методику капиллярного электрофореза [107].

### **1.3.3. Методы определения родственных примесей производных гуанидина**

Установлено, что метод ТСХ на пластинке, покрытой целлюлозой в системе растворителей ацетон-бензол-вода (12:6:1), можно применить для определения

допустимого содержания примеси исходного продукта синтеза в метформине [1].

Описано также применение метода тонкослойной хроматографии для определения примесей остаточных мономеров гуанидина в фармацевтических субстанциях. С.А. Кедик, Д.О. Шаталов, С.Г. Бексаев разработали методику ВЭЖХ с использованием метода внешнего стандарта для определения примесей гидрохлорида гуанидина [74].

### **Заключение по главе 1**

1. Анализ литературных источников показал, что производные хиназолина и гуанидина представлены различными лекарственными средствами с широким спектром фармакологического действия.

2. Для идентификации производных хиназолинона и производных гуанидина в основном применяются методы ИК-спектроскопии, УФ-спектрофотометрии, ТСХ, а также цветные химические реакции.

3. С целью установления количественного содержания основного вещества в соответствии с литературными данными и анализом ФС на субстанции используются как титриметрические методы, так и методы ВЭЖХ и УФ-спектрофотометрии, имеются сведения и о возможности применения метода капиллярного электрофореза.

4. Определение родственных примесей производных хиназолина и производных гуанидина проводится с использованием методов ТСХ и ВЭЖХ. Остаточные органические растворители определяют методом ГХ.

5. В литературе не найдено методик идентификации, определения родственных примесей, нет обоснования методов количественного определения нового БАС-хиназолин-4(3H)-она N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина, обладающего высокой кардиопротективной активностью. Таким образом, обоснование условий анализа методик идентификации и количественного определения с целью создания нормативной документации для этого соединения является целесообразной и актуальной задачей.

## ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Характеристика объектов, вспомогательных материалов, оборудования и реактивов

Объектами исследования служили 3 серии (2017, 2019, 2021) лабораторных образцов *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина (лабораторный шифр VMA-13-15), а также образцы исходного соединения синтеза VMA-13-15, который может обнаруживаться в образцах БАС в виде родственной примеси или продукта деструкции (незамещенный хиназолин-4(3*H*)-он).

Ввиду отсутствия стандартного образца (СО) использовался дважды перекристаллизованный из метанола и высушенный до постоянной массы полученный ранее образец VMA-13-15 (серия 2017), названный нами условным стандартным образцом (УСО). Хроматографическая чистота УСО была установлена в ходе разработки методики определения родственных примесей методом капиллярного электрофореза и подтверждена методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Количественное содержание VMA-13-15 в УСО было определено методом кислотно-основного титрования в неводных средах и составило 99,8%.

#### 2.1.1. Оборудование

Для выполнения экспериментальной части диссертационной работы нами были использованы следующие приборы и оборудование:

- Спектрофотометр СФ-2000 с программным обеспечением UVWIN для Windows («Аквилон», г. Москва);
- «ИК – Фурье спектрометр ФСМ 1201» (ООО «Инфраспек», г. Санкт-Петербург);
- пресс ручной гидравлический ПГР-400 (ООО «Инфраспек», г. Санкт-Петербург);

- рН-метр Hanna Edge 2002-02 (HANNA Instruments Inc., Hungary);
- анализатор жидкости «Эксперт-001» (Эконикс-Эксперт, Россия), снабженный стеклянным комбинированным электродом ЭКС-10601/7;
- аналитические весы Госметр ВЛ-124; ЛВ 210-А (ООО «Сартогосм», Россия);
- прибор для определения температуры плавления ПТП (М);
- для капиллярного электрофореза использовался прибор «Капель – 105м» (ОАО «Люмэкс-маркетинг», Россия); Кварцевый капилляр Lэфф/Лобщ=50/60 см;
- жидкостной хроматограф Dionex UltiMate 3000 со спектрофотометрическим детектором с использованием системы сбора и обработки хроматографических данных Chromeleon, версия 7 (фирма «Dionex» США);
- хроматографическая колонка из нержавеющей стали SYMMETRY SHIELD RP 18 размером 150 x 4,6 мм с размером частиц 5 мкм;
- центрифуга лабораторная с принадлежностями SIGMA 2-16P, производства «Сигма Лаборцентрифуген ГмбХ», Германия;
- фильтры Nylon Membrane, 0,2 µm 25 mm Syringe Filters, Phenomenex, США;
- газовый хроматограф «Кристалл-2000М» (зав. номер 6596);
- шкаф суховоздушный ШС-80 (ОАОКЗМА, Россия) ТУ 64-1-909-80;
- цилиндры мерные на 10, 50, 100, 500 мл;
- колбы мерные вместимостью 25, 50, 100, 250, 500 и 1000 мл;
- колбы конические вместимостью 50, 100 и 250 мл;
- бюретка градуированная на 25 мл;
- пипетки градуированные на 1, 2, 5, 10 мл;
- микробюретка на 10 мл;
- пробирки.

### 2.1.2. Растворители, реактивы, титрованные растворы, индикаторы

Все использованные в экспериментальных исследованиях растворители, реактивы и индикаторы соответствовали требованиям ГФ РФ XV изд. ОФС.1.3.0001 «Реактивы. Индикаторы». Для изготовления титрованных растворов опирались на требования ГФ РФ XV изд., ОФС.1.3.0002 «Титрованные растворы».

## 2.2. Методы исследования

Исследование БАС проводили с помощью следующих методов анализа, описанных в ГФ РФ XIV, том 1 (ОФС.1.1.0006.15. *Фармацевтические субстанции*).

**Описание.** Раздел составлен в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV, том 1, ОФС.1.1.0006.15.

**Растворимость** VMA-13-15 проверяли с учетом требований ГФ РФ XIV, том 1, ОФС.1.2.1.0005.15.

**Температуру плавления** определяли капиллярным методом в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV, том 1, ОФС.1.2.1.0011.18.

**Определение рН-раствора и кислотности или щелочности** проводили в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV, том 1, ОФС.1.2.1.0004.15 *Ионометрия*.

Испытуемый раствор готовили по методике: 0,1000 г (точная навеска) БАС растворяли в 10 мл воды очищенной. Далее прибавляли 0,1 мл раствора метилового красного. Раствор окрашивался в желтый цвет или розовый цвет. Желтые растворы титровали хлористоводородной кислотой раствором 0,01 М до появления розовой окраски, а розоватые – натрия гидроксида раствором 0,01 М до появления желтой окраски.

**Прозрачность и степень мутности жидкости** проверяли с учетом требований (ОФС.1.2.1.0007.15).

**Степень окраски жидкостей** (согласно ОФС.1.2.1.0006.15). Проводили

визуальную оценку раствора испытуемого образца и раствора эталона В<sub>9</sub>.

**Потерю в массе при высушивании** определяли в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV, том 1, ОФС.1.2.1.0010.15 по методике: около 0,5000 г (точная навеска) *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина помещали в предварительно высушенный до постоянной массы и взвешенный в условиях проведения бюкс в сушильный шкаф и высушивали при температуре от 100 до 105°C, до постоянной массы.

**Сульфатную золу и тяжелые металлы** определяли по методикам ГФ РФ XIV, том 1, ОФС.1.2.2.2.0014.15; ОФС.1.2.2.2.0012.15.

**Спектрометрия в инфракрасной области** выполнялась на ИК-спектрофотометре ФУРЬЕ – ФСМ 1201 в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV, том 1, ОФС.1.2.1.1.0002.15.

**Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях** выполнялась в соответствии с требованиями с ГФ РФ XIV, том 1, ОФС.1.2.1.1.0003.15. Для измерения УФ-спектров и расчета количественного содержания субстанции готовили растворы: около 0,05 г (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляли 30 мл соответствующего растворителя, взбалтывали до полного растворения и доводили этим же растворителем до метки (раствор А). При измерении спектра в области 250-280 нм 2 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили до метки соответствующим растворителем. При измерении оптической плотности в области 220-240 нм 10 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили соответствующим растворителем до метки (раствор Б), затем 2 мл раствора Б помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и далее поступали как описано выше. В качестве раствора сравнения использовали соответствующий растворитель. Для расчета содержания БАС в исследуемых образцах оптическую плотность полученных растворов измеряли при длинах волн 266 нм и 226 нм соответственно. Параллельно измеряли оптическую плотность растворов условного стандартного образца (УСО) субстанции.

*Приготовление раствора условного стандартного образца:* около 0,05 г (точная навеска) УСО (VMA-13-15) помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляли 30 мл соответствующего растворителя, взбалтывали до полного растворения и доводили этим же растворителем до метки. Далее готовили разведения согласно методике количественного определения БАС, описанной выше.

Расчет содержания в процентах ( $x$ ) VMA-13-15 в анализируемых образцах проводили с учетом оптической плотности УСО.

$$x = \frac{A_x \cdot C \cdot 50 \cdot 100 \cdot 100}{A_{ст} \cdot V \cdot a \cdot (100 - W)}, \quad (1)$$

где  $A_x$  – оптическая плотность испытуемого раствора;

$A_{ст}$  – оптическая плотность раствора УСО;

$V$  – аликвота, мл;

$a$  – навеска БАС, г;

$C$  – концентрация раствора УСО, %;

$W$  – потеря в массе при высушивании, %.

**Кислотно-основное титрование в неводных средах** в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV, том 1, ОФС.1.2.3.0014.15., по следующей методике: около 0,1 г БАС (точная навеска) растворяли в 20 мл уксусной кислоты ледяной. Полученный раствор титровали хлорной кислотой раствором 0,1 М, перемешивая после каждого добавления титранта. Конец титрования фиксировали потенциометрически. Параллельно проводили контрольный опыт. Поправочный коэффициент хлорной кислоты составил 1,02; 1 мл хлорной кислоты раствора 0,1 М соответствует 12,964 мг  $C_{12}H_{13}N_5O_2$ .

Расчет содержания в процентах ( $x$ ) VMA-13-15 в анализируемых образцах проводили по формуле:

$$x = \frac{(V - V_0) \cdot K \cdot T \cdot 100}{a \cdot 1000}, \quad (2)$$

где  $V$  – объем титранта, израсходованный на титрование в основном опыте, мл;

$V_0$  – объем титранта, израсходованный на титрование в контрольном

опыте, мл;

$K$  – поправочный коэффициент хлорной кислоты раствора 0,1 М;

$a$  – навеска, г.

**Анализ с использованием метода капиллярного электрофореза** проводили в соответствии с ГФ РФ XIV, ОФС.1.2.1.2.0022.15., используя систему капиллярного электрофореза «Капель – 105м» (ОАО «Люмэкс-маркетинг», Россия) с кварцевым капилляром  $L_{эфф}/L_{общ}=50/60$  см,  $ID=75$  мкм. Детектирование проводили с помощью УФ-детектора при длине волны 268 нм.

*Методика пробоподготовки.* Для предварительных исследований точную навеску (0,0155 г) образца БАС помещали в мерную колбу вместимостью 250 мл и растворяли в 50 мл воды для хроматографии, затем доводили этим же растворителем до метки и перемешивали. При помощи микропипетки отбирали последовательно от 300, 400, 500, 600 и 700 мкл полученного раствора, переносили в пробирки типа Эппендорф, прибавляли до 1000 мкл того же растворителя, перемешивали и центрифугировали при  $12000 \text{ мин}^{-1}$  5 мин. Полученные растворы с концентрацией 0,01860; 0,02480; 0,3100; 0,3720 и 0,434 мг/мл соответственно декантировали и подвергали анализу. Раствор УСО готовили аналогично.

*Предлагаемая методика.* Около 0,0500 г (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 25 мл воды для хроматографии и доводили этим же растворителем до метки. 2,5 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили водой для хроматографии до метки. Далее при помощи микропипетки отбирали 500 мкл полученного раствора, переносили в пробирку типа Эппендорф, прибавляли 500 мкл того же растворителя и далее поступали как описано в *методике пробоподготовки*.

Расчет содержания в процентах ( $x$ ) VMA-13-15 в анализируемых образцах проводили по формуле:

$$x = \frac{S \cdot a_0 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot (100 - W)}, \quad (3)$$

где  $S$  и  $S_0$  – площадь пика испытуемого образца и его УСО на ЭФГ испытуемого раствора и раствора УСО соответственно;

$a$  – навеска испытуемого образца, г;

$W$  – потеря в массе при высушивании, %;

$a_0$  – навеска УСО, г;

$P$  – содержание вещества в УСО, %.

### **Определение родственной примеси методом капиллярного электрофореза**

Модельный раствор примеси: точную навеску (0,0200 г) незамещенного хиназолин-4(3H)-она помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 80 мл воды для хроматографии для полного растворения субстанции. Далее объем раствора доводили водой для хроматографии до метки и перемешивали.

Испытуемый раствор: точную навеску (0,2000 г) УСО *N*-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 80 мл воды для хроматографии для полного растворения субстанции. Далее в эту мерную колбу вносили 1 мл модельного раствора примеси, доводили объем раствора водой для хроматографии до метки и перемешивали. Далее при помощи микропипетки отбирали 1 мл полученного раствора, переносили в микроцентрифужную пробирку типа Эппендорф и центрифугировали при 8000 об/мин в течение 5 минут. Расчет содержания в процентах ( $x$ ) примеси по отношению к приготовленной модельной смеси проводили по формуле:

$$X = \frac{S_x * C_{cm} * W * 100}{S_{cm} * 1000 * a * 1000}, \quad (4)$$

где  $S_x$  – площадь пика испытуемого образца;

$S_{cm}$  – площадь пика УСО;

$C_{cm}$  – концентрация УСО, мкг/мл;

$a$  – навеска БАС, г;

$W$  – объем мерной колбы, мл.

Для построения калибровочного графика растворы готовили следующим образом: в пять мерных колб вместимостью 100 мл помещали по 0,2000 г (точная навеска) УСО *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина, растворяли в 80 мл воды для хроматографии, в каждую колбу вносили по 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 и 2,5 мл модельного раствора примеси, доводили объем растворов водой для хроматографии до метки и перемешивали.

Для оценки по показателю «правильность» готовили растворы по методике: 0,2000 г (точная навеска) УСО VMA-13-15 помещали в 9 мерных колб вместимостью 100 мл, добавляли по 80 мл воды для хроматографии для полного растворения УСО, вносили аликвоты (по 0,5; 1,0 и 1,5 мл) модельного раствора примеси и доводили объем колб водой для хроматографии до метки. Далее при помощи микропипетки отбирали полученный раствор, переносили в микроцентрифужную пробирку типа Эппендорф и центрифугировали при 8000 об/мин в течение 5 мин.

**Анализ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии** проводили в соответствии с ГФ РФ XV, ОФС.1.2.1.2.0005.

Применяли обращенно-фазовый вариант ВЭЖХ. Использовали хроматограф «Стайер» (Аквилон, Россия), снабженный УФ-детектором UVV-104М (Аквилон, Россия). Неподвижной фазой выступала колонка Nucleosil C18 размером 150 × 4,6 мм с зернением октадецилсиликагеля равным 5 мкм (Nucleosil, США). Температура анализируемых образцов и колонки равнялась 20°C. Объем пробы составлял 20 мкл. Детектирование осуществляли спектрофотометрически при длине волны 254 нм. Анализ происходил в изократическом режиме элюирования со скоростью 1,0 мл в минуту. Подвижная фаза представляет собой смесь ацетонитрила и 0,5% муравьиной кислоты в соотношениях 20:80. Время анализа 10 минут.

**Методика 1. Определение VMA-13-15.** Около 0,05 г (точная навеска) БАС помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 25 мл воды для хроматографии и доводили этим же растворителем до метки. 2,5 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл доводили водой для

хроматографии до метки. Далее при помощи микропипетки отбирали 500 мкл полученного раствора, переносили в пробирку типа Эппендорф, прибавляли 500 мкл воды, перемешивали, центрифугировали при 12000 мин<sup>-1</sup> 5 мин. Надосадочный раствор декантировали и подвергали анализу. Аналогично готовили и подвергали анализу раствор УСО.

Расчет содержания в процентах ( $x$ ) VMA-13-15в анализируемых образцах проводили по формуле:

$$x = \frac{S \cdot a_0 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot (100 - W)}, \quad (5)$$

где  $S$  и  $S_0$  – площадь пика испытуемого БАС и его УСО на хроматограммах испытуемого раствора и раствора УСО соответственно;

$a$  – навеска испытуемого БАС, г;

$W$  – потеря в массе при высушивании БАС, %;

$a_0$  – навеска УСО БАС, г;

$P$  – содержание БАС в УСО, %.

*Для построения калибровочного графика готовили растворы по методике:* 0,0610 г (точная навеска) УСО VMA-13-15 помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 25 мл воды для хроматографии и доводили этим же растворителем до метки. 2,5 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл доводят водой для хроматографии до метки. При помощи микропипетки отбирали последовательно от 300, 400, 500, 600 и 700 мкл полученного раствора, переносили в пробирки типа Эппендорф, прибавляли до 1000 мкл того же растворителя, перемешивали и центрифугировали при 12000 мин<sup>-1</sup> 5 мин. Полученные растворы с концентрацией 0,0183; 0,0244; 0,3100; 0,3306 и 0,0427 мг/мл соответственно декантировали и подвергали анализу.

**Для определения примеси (незамещенный хиназолин-4(3H)-он) готовили следующие растворы.**

*Раствор примеси:* 0,0200 г (точная навеска) незамещенного хиназолин-4(3H)-она помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 80 мл

воды для хроматографии, после полного растворения объем раствора довели тем же растворителем до метки и перемешивали. 1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, довели объем тем же растворителем до метки и перемешивали.

*Модельный раствор:* 0,2000 г (точная навеска) УСО VMA-13-15 помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 80 мл воды для хроматографии, после полного растворения прибавляли 1 мл раствора примеси, довели объем тем же растворителем до метки и перемешивали. Далее с раствором сравнения и модельным раствором поступали, как описано в методике 1.

Расчет содержания в процентах ( $x$ ) примеси по отношению к приготовленной модельной смеси проводили по формуле:

$$x = \frac{S_x \cdot C_{np} \cdot W_1 \cdot W_2 \cdot 100}{S_{np} \cdot a_x \cdot V_a \cdot 1000}, \quad (6)$$

где  $S_x$  – площадь пика примеси в испытуемом образце;

$S_{np}$  – площадь пика раствора сравнения;

$C_{np}$  – концентрация раствора сравнения, мкг/мл;

$a_x$  – навеска испытуемого образца, г;

$W_1$  – объем мерной колбы, мл;

$W_2$  – объем раствора для хроматографирования, мкл;

$V_a$  – аликвота, мкл.

*Приготовление растворов для построения калибровочного графика примеси незамещенного хиназолин-4(3H)-она:* в пять мерных колб вместимостью 100 мл помещали по 0,2000 г (точная навеска) УСО VMA-13-15 растворяли в 80 мл воды для хроматографии, в каждую колбу прибавляли по 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 и 2,5 мл раствора примеси, довели объем тем же растворителем до метки и перемешивали. Далее поступали как описано в методике 1.

**Методика 2. Определение примеси (незамещенного хиназолин-4(3H)-она) в субстанции.** Около 0,1 г (точная навеска) субстанции помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 25 мл воды для хроматографии и

доводили этим же растворителем до метки. Параллельно готовили раствор примеси (см. выше). С приготовленными растворами поступали как описано в методике 1. Площадь пика примеси (время выхода 4,28 мин) не должна превышать площади пика раствора сравнения примеси.

**Остаточные органические растворители** определяли в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV, том 1, ОФС.1.1.0008.15, методом газовой хроматографии в соответствии с ГФ РФ XIV, том 1, ОФС.1.2.1.2.0004.15.

*Испытуемый раствор:* около 0,5 г (точная навеска) субстанции помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляли 5 мл воды для хроматографии и в течение 15 минут обрабатывали ультразвуком, объем раствора доводили тем же растворителем до метки, перемешивали.

*Стандартный раствор метанола:* около 1, 0 г (точная навеска) стандартного образца метанола помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в воде для хроматографии, объем раствора доводили до метки тем же растворителем и перемешивали. Далее 2 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили до метки водой для хроматографии и перемешивали.

*Стандартный раствор диэтилового эфира:* около 1 г (точная навеска) стандартного образца диэтилового эфира помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в воде для хроматографии, объем раствора доводили до метки тем же растворителем и перемешивали. Далее 2 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили до метки водой для хроматографии и перемешивали.

Хроматографирование проводили с использованием следующих условий:

- хроматографическая колонка – ZB-FFAP (50 м, 0,32 мм, 0,52 мкм);
- газ-носитель – азот;
- скорость газа-носителя – 0,5-1 мл/мин;
- деление потока 1:10;
- температура инжектора – 250°C, детектора – 220°C; температура колонки (изотерма) – 160°C (выдержано 5,5 мин);

- программирование температуры со скоростью 10°C/мин до 160°C;
- время анализа – 30 мин; на поддув детектора расход водорода – 25 мл/мин, воздуха – 250 мл/мин, азота – 40 мл/мин;
- объем вводимой пробы – 1 мкл.

Детектирующее устройство – детектор пламенно-ионизационный (ПИД).

Расчет содержания в процентах ( $x$ ) остаточных растворителей в субстанции проводили по формуле:

$$x = \frac{S_x \cdot C_{ст} \cdot 100 \cdot 100}{S_{ст} \cdot a \cdot 1000}, \quad (7)$$

где  $C_{ст}$  – количество СО в 1 мл стандартного раствора, мг;

$a$  – навеска БАС, г;

$S_x$  – площади пика исследуемого вещества;

$S_{ст}$  – площадь пика стандартного образца.

Содержание метанола не должно превышать 3000 ppm (0,3%), содержание диэтилового эфира не более 0,5%.

**Валидацию методик** осуществляли в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV, том 1, ОФС.1.1.0012.15.

**Статистическую обработку результатов химического эксперимента** проводили с помощью компьютерной программы Excel 2013 (Microsoft Office 2010) в соответствии с ГФ РФ XIV, том 1, ОФС.1.1.0013.15.

**Изучение стабильности и установление сроков годности БАС** проводили в соответствии с требованиями ГФ РФ XV, ОФС.1.1.0009.

## ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ N-[2-[4-ОКСО-3(4H)-ХИНАЗОЛИНИЛ]ПРОПИОНИЛ]-ГУАНИДИНА

Одним из важных этапов изучения нового биологически активного соединения является исследование подлинности, которое включает в себя разработку методик анализа физических, химических и физико-химических свойств. Обоснование показателей контроля качества N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина проводили в соответствии с требованиями ГФ РФ XV [17].

### 3.1. Изучение физических свойств N-[2-[4-оксо-3(4H)- хиназолинил]пропионил]-гуанидина

#### 3.1.1. Описание

По внешнему виду все серии образцов (VMA-13-15) представляют собой белые аморфные порошки, без запаха [51].

#### 3.1.2. Растворимость

Изучение растворимости проводили с растворителями, используемыми в фармацевтическом анализе. Результаты исследования представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Определение показателя «Растворимость» N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

| Растворитель                             | $\epsilon$ | Условный термин / растворимость в частях |
|--|------------|--|
| Вода очищенная                           | 78,30      | Растворим 1:30                           |
| Хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М | -          | Растворим 1:30                           |
| Натрия гидроксида раствор 0,1 М          | -          | Растворим 1:30                           |
| Спирт этиловый 96%                       | 24,30      | Мало растворим 1:1000                    |
| Метанол                                  | 33,1       | Мало растворим 1:1000                    |
| Ацетон                                   | 20,70      | Практически нерастворим 1:10000          |

## Продолжение Таблицы 3

|           |       |                                 |
|-----------|-------|---------------------------------|
| Хлороформ | 5,1   | Практически нерастворим 1:10000 |
| ДМФА      | 37,60 | Растворим 1:30                  |
| ДМСО      | 45    | Умеренно растворим 1:100        |
| Гексан    | 2,22  | Практически нерастворим 1:10000 |

Исходя из результатов, представленных в таблице 3, лучше всего соединение растворимо в водных растворах: в воде очищенной, в хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М и натрия гидроксида растворе 0,1 М, а также ДМФА. В полярных органических растворителях с высоким значением диэлектрической проницаемости ( $\epsilon > 20$ ), а именно в метаноле и спирте этиловом соединение мало растворимо и практически нерастворимо в неполярных растворителях, таких как хлороформ и гексан [51].

### 3.1.3. Температура плавления

Определение показателя проводили на трех сериях лабораторных образцов *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина на приборе ППТ (таблица 4).

Таблица 4 – Определение показателя «Температура плавления» *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

| Серия | Температура плавления, °С | Среднее значение, °С |
|-------|---------------------------|----------------------|
| 2017  | 268-270                   | 268-270              |
|       | 269-271                   |                      |
|       | 268-270                   |                      |
| 2019  | 269-270                   | 267-269              |
|       | 267-269                   |                      |
|       | 267-269                   |                      |
| 2021  | 268-270                   | 268-270              |
|       | 267-268                   |                      |
|       | 269-270                   |                      |

Интервал температуры плавления был установлен в пределах от 268 °С до 270°С, что в дальнейшем может служить показателем для определения чистоты и подлинности субстанции.

## 3.2. Показатели контроля качества и пределы нормирования

### 3.2.1. Определение рН и кислотности или щелочности

Для установления рН исследование проводили на трех сериях БАС потенциометрическим методом, согласно (ОФС.1.2.1.0004). Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты определения рН 1% водного раствора *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

| Серия | рН-раствора | Среднее значение |
|-------|-------------|------------------|
| 2017  | 5,45        | 5,55             |
|       | 5,66        |                  |
|       | 5,55        |                  |
| 2019  | 5,61        | 5,60             |
|       | 5,58        |                  |
|       | 5,60        |                  |
| 2021  | 5,45        | 5,44             |
|       | 5,40        |                  |
|       | 5,47        |                  |

Исходя из полученных результатов значения рН (таблица 5), для определения показателя «Кислотность или щелочность» мы использовали кислотно-основное индикаторное титрование. В качестве индикатора использовали метиловый красный спиртовой раствор 0,1%, переход окраски от красной к желтой в интервале рН 4,2 – 6,2. Результаты титрования 3 серий VMA-13-15 приведены в таблице 6.

Таблица 6 – Результаты определения показателя «Кислотность или щелочность» *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

| Серия                  | V <sub>HCl</sub> , мл | V <sub>NaOH</sub> , мл |
|------------------------|-----------------------|------------------------|
| 2017 раствор желтый    | 0,15                  | -                      |
| 2019 раствор розоватый | -                     | 0,15                   |
| 2021 раствор желтый    | 0,10                  | -                      |

Полученные данные (таблицы 6) свидетельствуют о том, что окраска индикатора должна измениться от прибавления не более 0,15 мл

хлористоводородной кислоты раствора 0,01 М или натрия гидроксида раствора 0,01 М.

### 3.2.2. Прозрачность и цветность растворов

Для определения прозрачности и цветности растворов VMA-13-15 готовили 1% водные растворы [17]. Результаты анализа растворов представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Результаты определения показателей «Прозрачность» и «Цветность» раствора *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

| Серия | Прозрачность раствора | Цветность раствора                          |
|-------|-----------------------|---|
| 2017  | Раствор прозрачный    | Не превышает окраску эталона В <sub>9</sub> |
| 2019  | Раствор прозрачный    | Не превышает окраску эталона В <sub>9</sub> |
| 2021  | Раствор прозрачный    | Не превышает окраску эталона В <sub>9</sub> |

Согласно данным таблицы 7, растворы VMA-13-15 по показателю «Прозрачность и степень мутности» являются прозрачными, а по показателю «Степень окраски жидкостей» бесцветными, так как не превышают эталон В<sub>9</sub>.

### 3.2.3. Определение потери в массе при высушивании, сульфатной золы и тяжелых металлов

Установление показателя «Потеря в массе при высушивании» проводили согласно ГФ РФ XV издания (ОФС.1.2.1.0010) – способ 1 [17]. Определение показателей качества «Сульфатная зола» и «Тяжелые металлы» проводили с учетом требований ОФС.1.2.2.2.0014 и ОФС.1.2.2.2.0012 соответственно [17]. Результаты определения представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Определение показателей «Потеря в массе при высушивании», «Сульфатная зола» и «Тяжелые металлы»

| Серия               | Потеря в массе при высушивании, % | Сульфатная зола, % | Тяжелые металлы                          |
|---------------------|-----------------------------------|--------------------|--|
| 2017                | 0,3933                            | 0,026              | Не превышает окраску эталонного раствора |
| 2019                | 0,3948                            | 0,048              | Не превышает окраску эталонного раствора |
| 2021                | 0,4331                            | 0,042              | Не превышает окраску эталонного раствора |
| Среднее значение, % | 0,4270                            | 0,038              |  |

Таким образом, полученные результаты (таблица 8) позволяют установить предварительные пределы нормирования для следующих показателей для VMA-13-15: потеря в массе при высушивании не более 0,5%, сульфатная зола – не более 0,1%. При установлении показателя «Тяжелые металлы» исследуемый раствор *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина выдерживает испытания в сравнении с эталонным раствором свинец-иона (5 мкг/мл).

### 3.3. Разработка методик определения подлинности *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

#### 3.3.1. Изучение спектральных характеристик

Для установления подлинности *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина были зарегистрированы и изучены его спектры в инфракрасной и ультрафиолетовой областях.

##### 3.3.1.1. Спектрометрия в инфракрасной области

Метод ИК-спектрометрии нашел широкое применение для установления подлинности веществ, потому что анализ спектра БАС позволяет идентифицировать полосы поглощения, соответствующие определенным функциональным группам в структуре соединения [28].

На рисунке 4 приведен ИК-спектр поглощения лабораторного образца

*N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина.

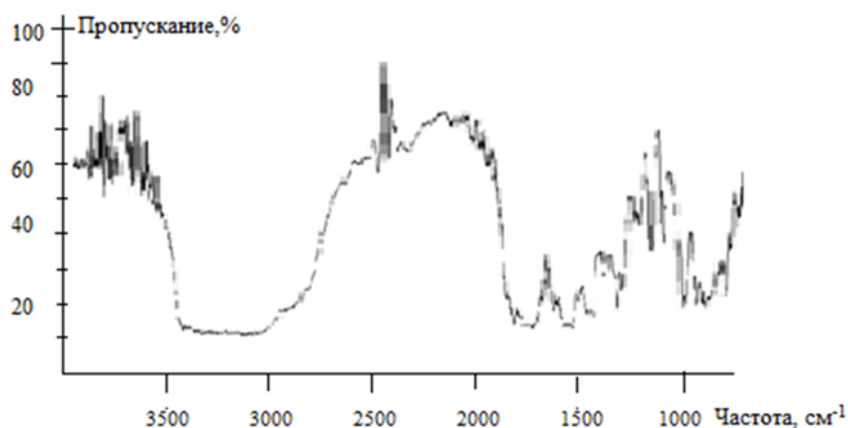


Рисунок 4 – ИК-спектр лабораторного образца субстанции *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

В соответствии с ОФС.1.2.1.1.0002 «Спектрометрия в инфракрасной области» идентификацию проводят в сравнении с измеренным спектром условного стандартного образца [17]. Поэтому был зарегистрирован ИК-спектр УСО (рисунок 5).

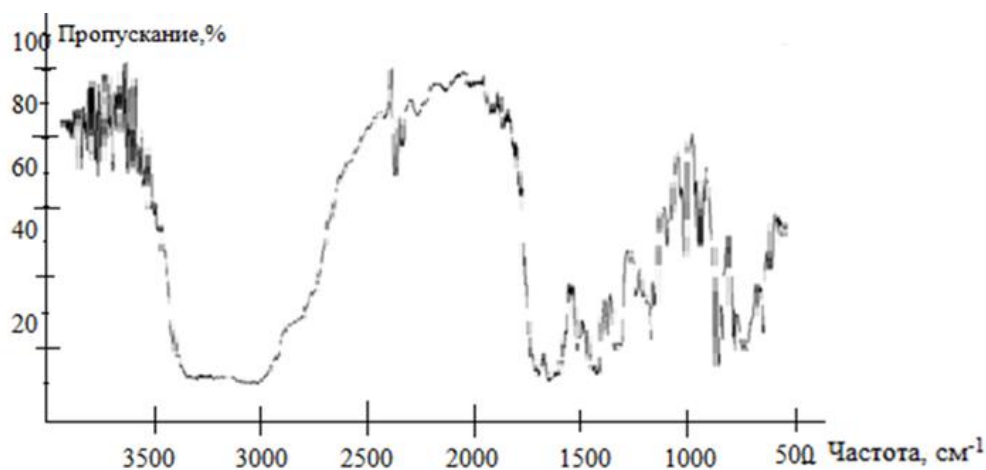


Рисунок 5 – ИК-спектр условного стандартного образца *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

Приведенные ИК-спектры (рисунки 4 и 5) оказались идентичны, что свидетельствует о подлинности исследуемого образца VMA-13-15. На основании анализа полученных ИК спектров и литературных данных составлена таблица

отнесения полос поглощения к структурным фрагментам молекулы *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина (таблица 9) [36].

Таблица 9 – Отнесение полос поглощения к структурным фрагментам субстанции

| Измеренная полоса поглощения, см <sup>-1</sup> | Диапазон частот, см <sup>-1</sup> , интенсивность полос поглощения | Группы и типы колебаний                        |
|--|--|--|
| 900,875  | 900-650  | Колебания кольца СН                            |
| 1600   | 1632-1595  | С=С, валентные колебания ароматического кольца |
| 1665   | 1670-1650(сл.)   | С=О, деформационные                            |
| 1594   | 1660-1590 (ср.)  | С=N, деформационные                            |
| 3500-3000                                      | 3500-3300  | NH <sub>2</sub> , валентные                    |

Доказательством структуры соединения послужило наличие на ИК-спектре характерных для основных функциональных групп полос поглощения (таблица 9).

Спектры лабораторных образцов *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина оказались идентичны со спектром УСО по положению и интенсивности полос поглощения.

### 3.3.1.2. Спектрофотометрия в ультрафиолетовой области

Нами было изучено поглощение VMA-13-15 в растворителях, в которых возможно растворение соединения: в воде очищенной, в спирте этиловом 96%, в хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М и в натрия гидроксида растворе 0,1 М [44]. Для измерения УФ-спектров нами были приготовлены растворы по методике, представленной в главе 2. В качестве раствора сравнения использовали соответствующий растворитель. Полученные спектры представлены на рисунке 6.

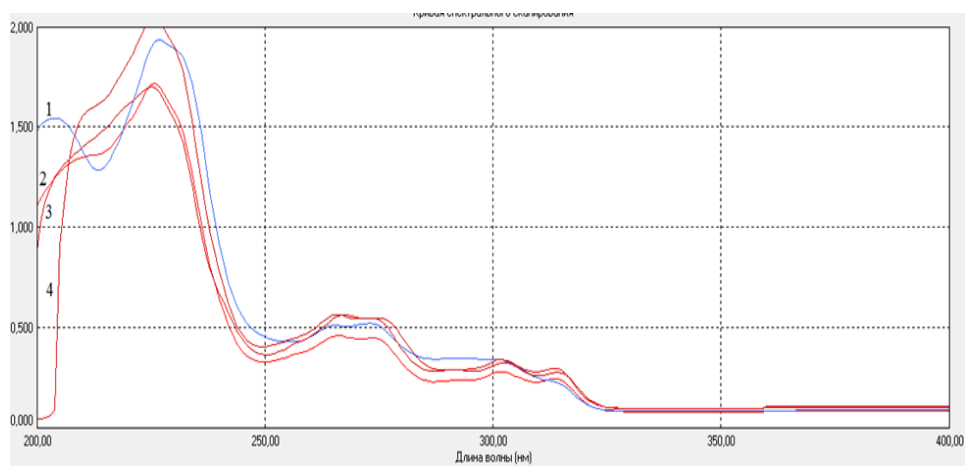


Рисунок 6 – УФ-спектры поглощения растворов УСО в хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М (1), воде очищенной (2), спирте этиловом 96% (3), натрия гидроксида растворе 0,1 М (4)

Как следует из рисунка, спектры поглощения УСО *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина, как в воде очищенной, так и в натрия гидроксида растворе 0,1 М, 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 хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М наблюдается только два максимума поглощения при 227 нм и 273 нм соответственно. Спектр поглощения в спирте этиловом 96%, имеет высокоинтенсивный максимум при 226 нм и низкоинтенсивные максимумы при 266 нм и 302 нм, так же как спектры в воде очищенной и 0,1 М натрия гидроксида растворе. 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 [12].

Оптические параметры электронных спектров поглощения изучаемого соединения, имеющие четко выраженные значения положения максимумов и минимумов поглощения позволяют их использовать для дополнительной идентификации при создании проекта НД, а именно: УФ-спектр поглощения

0,001% раствора БАС с использованием в качестве растворителя воды очищенной в области от 200 до 400 нм должен иметь максимумы поглощения при 226+2 нм, 266+2 нм и 302+2 нм.

### 3.4. Реакции подлинности

Анализ структурной формулы вещества позволил выявить следующие функциональные группы: третичная аминогруппа, оксо-группа пиримидинового кольца хиназолинона, пропионил, остаток гуанидина.

Исходя из строения вещества, нами был выбран ряд химических реакций для подтверждения подлинности исследуемого БАС.

Для подтверждения третичной аминогруппы нами были проведены реакции с общеалкалоидными реактивами (реактивы Драгендорфа, Бушарда, Майера, кремневольфрамовая кислота), так как они отличаются высокой чувствительностью [35]. Для определения чувствительности использовали метод последовательных разведений для реакций, протекающих в растворе. Положительный эффект обнаружен только при использовании реактива Драгендорфа (осадок темно-коричневого цвета), самого высокочувствительного общеалкалоидного реактива. Предел обнаружения реакции – 0,00005 г/мл.

Кроме основных третичная аминогруппа проявляет сильные восстановительные свойства, поэтому она окисляется с образованием окрашенных продуктов. Для этой цели используют специальные алкалоидные реактивы: кислота азотная концентрированная (желтое окрашивание), кислота серная концентрированная (желтое, переходящее в оранжевое), реактивы Эрдмана (желтое, переходящее в красное), Манделина (желтое, переходящее в зеленое) и Фреде (зеленое, переходящее в синее) [88]. Реакции проводили по следующей методике: в фарфоровую чашку помещали 0,05 г вещества в виде порошка и прибавляли 1-2 капли соответствующего реактива, осторожно нагревали. Чувствительность реакций составила 0,00050 г.

Для подтверждения кислотных свойств VMA-13-15 были использованы

реакции соле- и комплексообразования с такими реактивами, как железа(III) хлорида раствор 5%, серебра нитрата раствор 2% и кобальта нитрата раствор 5%. Положительный эффект дали реакции с железа(III) хлорида раствор 5% и серебра нитрата раствор 2%, чувствительность которых составила 0,0005 г/мл. При использовании в качестве реактива раствора кобальта нитрата появление осадка не наблюдалось [28].

Реактивы раствор 2,4-динитрофенилгидразина и щелочной раствор гидроксиламина использовали для доказательства кетогруппы пиримидинового кольца хиназолинона. Положительный аналитический эффект (темно-оранжевое окрашивание) наблюдали с раствором 2,4-динитрофенилгидразина, как с более чувствительным реактивом по сравнению с гидроксиламином. Чувствительность реакции – 0,001 г/мл.

Для обнаружения остатка гуанидина в исследуемом БАС были предложены две реакции: реакция Сакагучи (наблюдали появление красного окрашивания; чувствительность реакции – 0,001 г/мл) и реакция с реактивом Несслера (наблюдали изменение окраски в оранжевый цвет, при нагревании выпадал осадок желтого цвета; чувствительность реакции – 0,005 г/мл).

Ввиду того, что соединение представляет собой амид остатка пропионовой кислоты и гуанидина был проведен щелочной гидролиз. Ощущали запах аммиака, лакмусовая бумага окрасилась в синий цвет. Чувствительность реакции составила 0,002 г/мл. При добавлении кислоты хлористоводородной концентрированной наблюдали выпадение осадка белого цвета, что подтверждает положительный эффект проведенной реакции гидролиза.

Так, наиболее чувствительными оказались реакции с реактивом Драгендорфа, с железа(III) хлорида раствором 5%, серебра нитрата раствором 2%, а также с *α*-нафтолом инатрия гипобромитом в щелочной среде. Применение данных реактивов будет способствовать обнаружению третичной аминогруппы, карбамидной группы, а также остатка гуанидина.

### Заключение по главе 3

1. Установлены в соответствии с рекомендациями ГФ РФ 15 издания основные фармакопейные показатели контроля качества и пределы нормирования *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина. Данные показатели (описание, растворимость, температура плавления, прозрачность и цветность растворов, рН раствора, кислотность или щелочность, потеря в массе при высушивании, сульфатная зола и тяжелые металлы) были включены в проект НД на субстанцию.

2. Идентифицированы основные полосы поглощения субстанции VMA-13-15 в ИК-области спектра. Доказательством структуры соединения послужило наличие на ИК-спектре, характерных полос поглощения основных функциональных групп *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина. Кроме того, спектры лабораторных образцов оказались идентичны со спектром УСО по положению и интенсивности полос поглощения, что позволяет включить данную методику в проект НД для подтверждения подлинности исследуемого БАС.

3. Изучение УФ-спектров субстанции в различных растворителях позволило разработать методику идентификации *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина и включить ее в проект НД в следующей редакции: УФ-спектр поглощения 0,001% раствора БАС с использованием в качестве растворителя воды очищенной должен иметь максимумы поглощения при  $226 \pm 2$  нм,  $266 \pm 2$  нм, и  $302 \pm 2$  нм.

4. Исходя из наличия в структуре вещества таких функциональных групп, как третичная аминогруппа, кетогруппа пиримидинового кольца хиназолинона, остаток пропионовой кислоты, остаток гуанидина, обоснованы химические реакции для подтверждения подлинности исследуемой субстанции. Установлена чувствительность реакций методом последовательных разведений. Реакция на определение гуанидинового остатка с *α*-нафтолом и натрия гипобромитом в щелочной среде включена в проект НД.

## ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ *N*-[2-[4-ОКСО-3(4*H*)-ХИНАЗОЛИНИЛ]ПРОПИОНИЛ]- ГУАНИДИНА

Одним из этапов создания нормативной документации нового лекарственного средства является разработка методик количественного определения действующего вещества в фармацевтической субстанции. При этом большое значение имеют методы анализа, позволяющие быстро и надежно выявить отклонения в качестве и свойствах субстанции на самых ранних стадиях исследования [79].

Анализ литературы показал, что для количественного определения содержания БАС в фармацевтическом анализе, в большинстве случаев, применяют титриметрические методы. Эти методы не требуют наличия стандартного образца исследуемого вещества и дорогостоящего оборудования, они отличаются высокой точностью, быстротой и простотой выполнения [93]. Кроме того, при наличии стандартных образцов или достоверных значений удельного показателя поглощения, простым и надежным методом контроля качества ЛС является метод ультрафиолетовой (УФ) спектрофотометрии. Применение этого метода отличается высокой специфичностью, воспроизводимостью и точностью и позволяет значительно упрощать методики количественного анализа.

### 4.1. Определение констант ионизации

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.

Важным параметром физико-химических свойств вещества, характеризующих кислотно-основные свойства БАС, является константа ионизации. Константы ионизации (рКа) определяли с помощью электронного ресурса [chemicalize.com](http://chemicalize.com) (рисунок 7), при этом оказалось, что БАС имеет константу как кислоты  $pK_1=11,3$  и как основания 2 константы  $pK_3=4,71$  и  $pK_2=8,77$  [76].

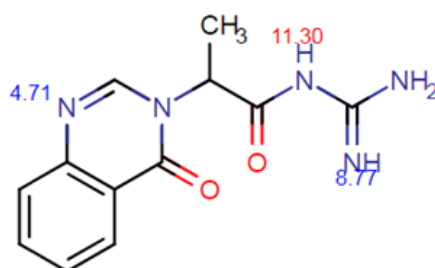


Рисунок 7 – Определение констант ионизации *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

Полученные значения рКа позволили рассчитать количества молекулярной и ионизированной формы БАС (%) в зависимости от рН среды водного раствора и построить график этой зависимости (рисунок 8).

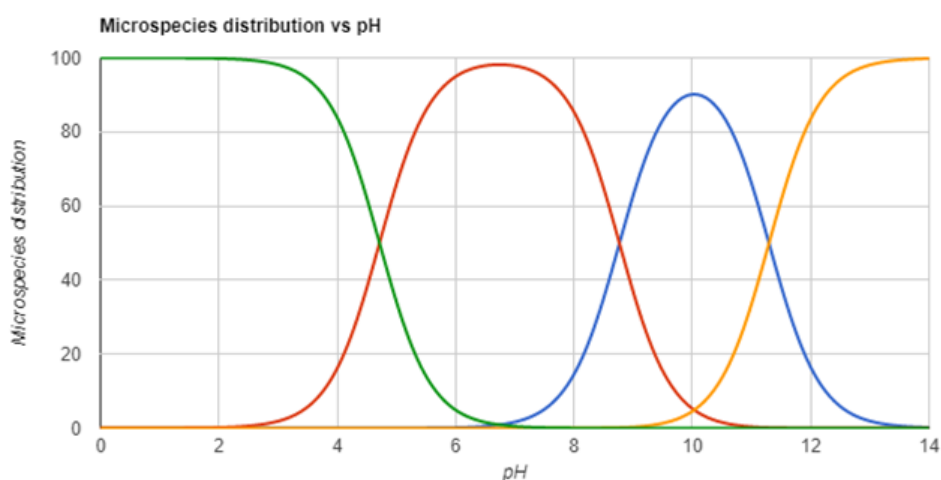


Рисунок 8 – График зависимости молекулярной и ионизированной формы *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина (%) в зависимости от рН среды

Значения  $pK=4,71$  и  $pK=8,77$  свидетельствуют, что молекула БАС в растворе может проявлять основные свойства и быть полностью ионизированной на 99,9% как основание по третичным аминогруппам ядра пиримидина в 4-оксохиназолине и гуанидине только при  $pH \leq 1,7$  и на 99% в растворах со значениями pH менее или равным 2,7. Как ионизированная на 99,9% кислота исследуемое БАС может существовать в растворе при pH равном или более 14,3. Так как водные растворы субстанции, приготовленные для измерения оптической плотности, имеют значения pH в области 5,5-5,7 можно считать, что в растворе содержится смесь молекулярной и ионизированных форм субстанции, как основания, так и кислоты. В полностью ионизированной форме, как кислоты субстанция находится в растворах при pH более 14. При pH более 13 (натрия гидроксида раствор 0,1 М) можно считать, что ионизированная форма в растворе содержится на 99% ( $pH=pK \pm 2$ ) [76].

Так как лучшим способом определения констант ионизации является потенциометрия, нами проведено практическое подтверждение значений  $pK$ , полученных при помощи электронного ресурса [chemicalize.com](http://chemicalize.com) [104].

*Методика 1:* 0,1296 г (точная навеска) образца *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина растворяли в 47,5 мл воды очищенной. К полученному раствору 10 порциями, каждая из которых равна одной десятой эквивалента, добавляли титрант натрия гидроксида раствор 0,1 М, перемешивали и после каждого добавления, как только установится равновесие, замеряли значение pH. Полученные результаты представлены в таблице 10 [76].

Таблица 10 – Результаты определения константы ионизации *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина (титрант натрия гидроксида раствор 0,1 М)

| Объем титранта, мл | Значение pH раствора | Стехиометрические концентрации |                | ВН <sup>+</sup><br>В <sup>-</sup> | lg чисел из столбца 5 | pKa (сумма чисел из столбцов 2 и 6) |
|--------------------|----------------------|--------------------------------|----------------|-----------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|
|                    |                      | ВН <sup>+</sup>                | В <sup>-</sup> |                                   |                       |                                     |
| 1                  | 2                    | 3                              | 4              | 5                                 | 6                     | 7                                   |
| 0                  | 5,87                 | 0,010                          | 0              | -                                 | -                     | -                                   |
| 0,5                | 11,05                | 0,009                          | 0,001          | 9/1                               | 1,60                  | 12,65                               |
| 1,0                | 11,34                | 0,008                          | 0,002          | 8/2                               | 1,25                  | 12,59                               |
| 1,5                | 11,51                | 0,007                          | 0,003          | 7/3                               | 1,05                  | 12,56                               |

## Продолжение Таблицы 10

|                      |       |       |       |     |      |            |
|----------------------|-------|-------|-------|-----|------|------------|
| 2,0                  | 11,63 | 0,006 | 0,004 | 6/4 | 0,90 | 12,53      |
| 2,5                  | 11,72 | 0,005 | 0,005 | 5/5 | 0,77 | 12,49      |
| 3,0                  | 11,79 | 0,004 | 0,006 | 4/6 | 0,64 | 12,43      |
| 3,5                  | 11,86 | 0,003 | 0,007 | 3/7 | 0,57 | 12,43      |
| 4,0                  | 11,91 | 0,002 | 0,008 | 2/8 | 0,47 | 12,38      |
| 4,5                  | 11,95 | 0,001 | 0,009 | 1/9 | 0,37 | 12,32      |
| 5,0                  | 11,99 | 0     | 0,010 | -   | -    | -          |
| Среднее значение рКа |       |       |       |     |      | 12,49±0,08 |

*Методика 2:* 0,1297 г (точная навеска) образца *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина растворяли в 47,5 мл воды очищенной. К полученному раствору 10 порциями, каждая из которых равна одной десятой эквивалента, добавляли титрант хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М, перемешивали и после каждого добавления, как только установится равновесие, измеряли значение рН. Полученные результаты представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Результаты определения константы ионизации *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина (титрант хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М)

| Объем титранта, мл   | Значение рН раствора | Стехиометрические концентрации |                | ВН <sup>+</sup><br>В <sup>-</sup> | lg чисел из столбца 5 | рКа (сумма чисел из столбцов 2 и 6) |
|----------------------|----------------------|--------------------------------|----------------|-----------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|
|                      |                      | ВН <sup>+</sup>                | В <sup>-</sup> |                                   |                       |                                     |
| 1                    | 2                    | 3                              | 4              | 5                                 | 6                     | 7                                   |
| 0                    | 5,90                 | 0                              | 0,010          | -                                 | -                     | -                                   |
| 0,5                  | 3,93                 | 0,001                          | 0,009          | 1/9                               | -1,014                | 2,92                                |
| 1,0                  | 3,62                 | 0,002                          | 0,008          | 2/8                               | -0,67                 | 2,95                                |
| 1,5                  | 3,44                 | 0,003                          | 0,007          | 3/7                               | -0,44                 | 3,0                                 |
| 2,0                  | 3,24                 | 0,004                          | 0,006          | 4/6                               | -0,28                 | 2,96                                |
| 2,5                  | 3,09                 | 0,005                          | 0,005          | 5/5                               | -0,28                 | 2,81                                |
| 3,0                  | 2,95                 | 0,006                          | 0,004          | 6/4                               | -0,021                | 2,93                                |
| 3,5                  | 2,82                 | 0,007                          | 0,003          | 7/3                               | 0,085                 | 2,91                                |
| 4,0                  | 2,71                 | 0,008                          | 0,002          | 8/2                               | 0,18                  | 2,88                                |
| 4,5                  | 2,60                 | 0,009                          | 0,001          | 9/1                               | 0,26                  | 2,87                                |
| 5,0                  | 2,52                 | 0,010                          | 0              | -                                 | -                     | -                                   |
| Среднее значение рКа |                      |                                |                |                                   |                       | 2,91±0,04                           |

Константы ионизации, полученные практическим путем, хотя и отличаются от рассчитанных, но также подтверждают наличие амфотерных свойств *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина.

## 4.2. Разработка и валидация методики количественного определения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом кислотно-основного титрования

Полученные данные о значениях  $pK_a$  свидетельствуют об амфотерных свойствах VMA-13-15. В связи с этим нами были проведены предварительные исследования по возможности применения кислотно-основного титрования. Для этого навески определяемого вещества титровали как в водных, так и в спиртовых средах натрия гидроксидом раствором 0,1 М и хлористоводородной кислотой раствором 0,1 М. Результаты потенциометрического титрования представлены на рисунке 9.

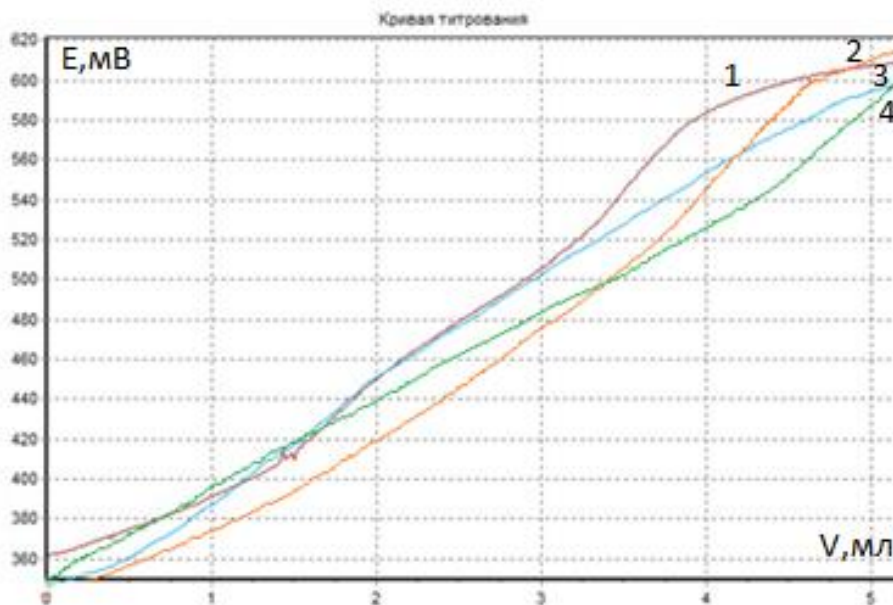


Рисунок 9 – Кривая потенциометрического титрования *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина в водных (1 – с натрия гидроксида раствором 0,1 М, 2 – с хлористоводородной кислотой раствором 0,1 М) и спиртовых (3 – с натрия гидроксида раствором 0,1 М, 4 – с хлористоводородной кислотой раствором 0,1 М) средах

Полученные кривые титрования свидетельствуют об отсутствии четкого скачка титрования. То есть водно-спиртовые растворы невозможно использовать для кислотно-основного титрования исследуемого соединения. В среде

протофильных растворителей также не наблюдалось скачка титрования. Поэтому нами исследована возможность разработки методики количественного определения методом неводного титрования в среде протогенных растворителей.

Изучение методик количественного определения действующих ФС на субстанции органических азотсодержащих оснований показало, что рекомендуется использовать в качестве растворителей уксусную кислоту ледяную, уксусный ангидрид, муравьиную кислоту, а также их смеси с другими растворителями (таблица 12) [76].

Таблица 12 – Растворители, использованные для титрования *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

| № п/п | Протогенные растворители                      | Соотношение растворителей, мл |
|-------|---|-------------------------------|
| 1.    | Уксусная кислота ледяная                      | 20                            |
| 2.    | Уксусная кислота ледяная / Уксусный ангидрид  | 20:5                          |
| 3.    | Уксусная кислота ледяная / Муравьиная кислота | 30:1                          |
| 4.    | Уксусный ангидрид                             | 10                            |
| 5.    | Уксусная кислота ледяная / Бензол             | 15:15                         |

Используя указанные в таблице 12 протогенные растворители, нами было проведено потенциметрическое титрование навески субстанции, в количестве 0,1000 г хлорной кислоты раствором 0,1 М. Результаты представлены на рисунке 10.

Как следует из рисунка 10, при использовании смесей уксусной кислоты ледяной с муравьиной кислотой, с уксусным ангидридом и бензолом, а также при использовании в качестве растворителя уксусного ангидрида не наблюдалось четкого скачка титрования, что свидетельствует о невозможности их применения для количественного определения БАС.

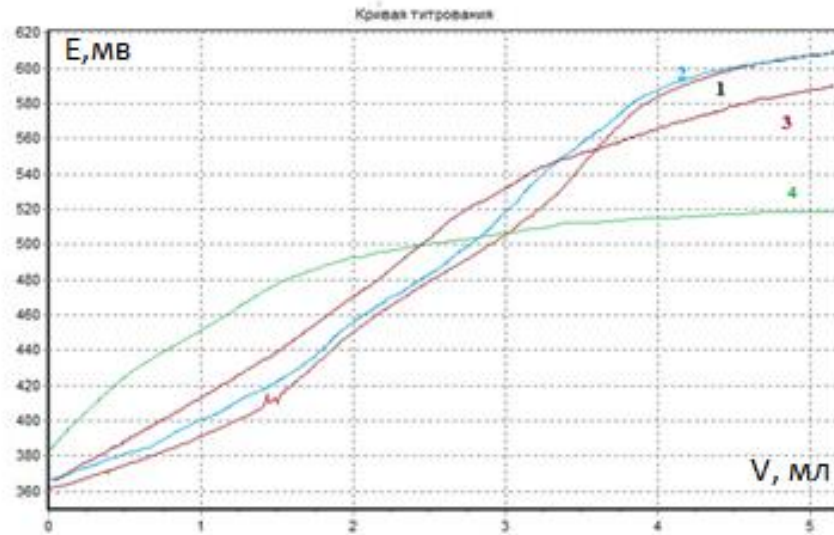


Рисунок 10 – Кривые потенциметрического титрования *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина в среде уксусного ангидрида (1), смесей уксусной кислоты ледяной с муравьиной кислотой (2), с уксусным ангидридом (3) и бензолом (4)

Только в среде уксусной кислоты ледяной наблюдался скачок титрования в пределах 550-640 Мв (рисунок 11). Поэтому для определения количественного содержания методом кислотно-основного титрования в неводных средах в качестве растворителя была выбрана уксусная кислота ледяная [76].

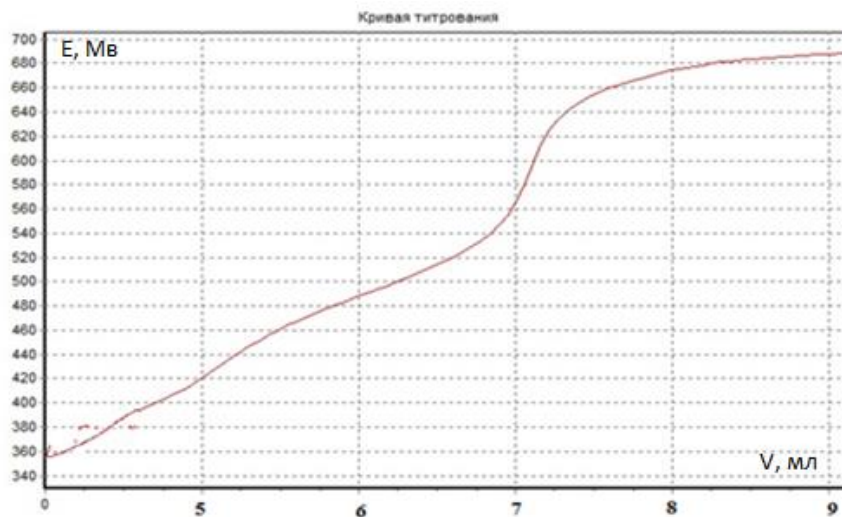


Рисунок 11 – Кривая потенциметрического титрования в среде уксусной кислоты ледяной *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

При создании методики (глава 2) нами предварительно было изучена

возможная реакция и рассчитан титр хлорной кислоты по *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидину. Как свидетельствуют полученные данные, на навеску БАС 0,1025 г (точная навеска) было израсходовано 7,8 мл хлорной кислоты раствора 0,1 М. Так как молярная масса *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина равна 259,2 в реакции участвовало  $(0,1025 : 259,2 = 0,0003954$  моля) БАС. На данную навеску было израсходовано 7,8 мл хлорной кислоты раствора 0,1 М ( $K=1,02$ ) (М.м. хлорной кислоты 100,46) в котором содержится 0,0795 г хлорной кислоты. Поэтому в реакцию вступило 0,0007914 моля хлорной кислоты (т.к.  $0,0795 : 100,42 = 0,0007914$ ). Таким образом, реакция протекает в стехиометрическом соотношении 1:2, так как  $0,000795 : 0,0003954 = 2,001$ . В связи с этим титр хлорной кислоты раствора 0,1 М будет равен  $T = \frac{259,2 \times 0,1 \times 1}{2} = 12,96$  мг. Полученное значение позволило нам рассчитать количественное содержание *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина в лабораторных образцах [76].

Современные требования к аналитическим методикам диктуют необходимость их валидации. Практика валидационных экспериментов дает понимание сути методики и осознание необходимости строгого соблюдения ее параметров [5].

Для валидационной оценки методики количественного определения VMA-13-15 титриметрическим методом в неводных средах проведено установление характеристик: специфичность, линейность, правильность, повторяемость (сходимость) в аналитической области методики [104].

Специфичность подтверждена отсутствием влияния растворителя на результаты титрования испытуемого раствора. Доказано, что используемый растворитель не искажает результатов количественного определения исследуемой субстанции, следовательно, валидируемая методика специфична.

Для определения линейной зависимости проводили статистическую обработку выборки, полученной в результате анализа модельных проб на пяти уровнях концентрации в диапазоне 80–120% от номинальной концентрации

исследуемого образца в растворе (таблица 13). Рассчитано уравнение калибровочного графика  $y = 74,18x + 0,140$ .

Таблица 13 – Характеристики линейной зависимости

| Навеска, г | Объем, мл | Параметры линейной зависимости |                 |
|------------|-----------|--------------------------------|-----------------|
| 0,0859     | 6,5       | $b=74,18$                      | $a=0,140$       |
| 0,0955     | 7,2       | $S_a=0,15$                     | $S_b=1,50$      |
| 0,1025     | 7,8       | $\Delta_a=0,49$                | $\Delta_b=4,79$ |
| 0,1112     | 8,4       | $r=0,9987$                     |                 |
| 0,1198     | 9,0       |                                |                 |

Таким образом, доказана линейная зависимость анализируемого вещества в диапазоне концентраций от 80 до 120%, так как значение коэффициента корреляции равно 0,9987.

При валидации методики по показателю «правильность» использовали данные, полученные при проверке линейности методики. Рассчитанное абсолютное значение свободного члена уравнения линейной регрессии 0,140 не превышает свой доверительный интервал 0,49, следовательно, методика свободна от систематической погрешности и дает правильные результаты.

Показатель «сходимость» результатов методики количественного определения определяли по результатам титрования УСО (6 параллельных определений). По результатам анализа рассчитывали величину относительного стандартного отклонения выборки, которое не должно превышать 2% [118]. Результаты исследования сходимости валидируемой методики приведены в таблице 14 [76].

Таблица 14 – Результаты определения сходимости результатов количественного определения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

| Навеска, г | V, мл | Найдено, % | Метрологические характеристики   |
|------------|-------|------------|--|
| 0,1025     | 7,8   | 100,59     | $\bar{x}=99,79$<br>$S_r=0,75$<br>$RSD\bar{x}=0,75\%$<br>$\Delta\bar{x}=0,79$<br>$\varepsilon=0,79\%$ |
| 0,1055     | 7,9   | 98,99      |  |
| 0,0998     | 7,6   | 100,67     |  |
| 0,1034     | 7,8   | 99,71      |  |
| 0,1029     | 7,7   | 98,92      |  |
| 0,0993     | 7,5   | 99,84      |  |

Как следует из данных, представленных в таблице 14, величина RSD составляет 0,75%, что свидетельствует о приемлемой сходимости результатов количественного определения.

На следующем этапе наших исследований мы провели проверку по показателю внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность. Для оценки данного параметра использовали  $t$ -критерий Стьюдента.

Таблица 15 – Результаты определения внутрилабораторной прецизионности результатов количественного определения  $N$ -[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

| 1-й день анализа                                 |       |            | 2-й день анализа                                |       |            |
|--|-------|------------|---|-------|------------|
| Навеска, г                                       | V, мл | Найдено, % | Навеска, г                                      | V, мл | Найдено, % |
| 0,1022   | 7,8   | 100,62     | 0,0995  | 7,5   | 99,67      |
| 0,0997   | 7,7   | 102,12     | 0,1048  | 7,8   | 98,41      |
| 0,1050   | 7,9   | 99,48      | 0,1055  | 7,9   | 99,01      |
| 0,0992   | 7,5   | 99,97      | 0,0998  | 7,6   | 100,62     |
| 0,1016   | 7,6   | 98,91      | 0,1001  | 7,7   | 101,71     |
| 0,1005   | 7,6   | 99,99      | 0,1032  | 7,8   | 99,94      |
| Метрологические характеристики                   |       |            |   |       |            |
| $\bar{x} = 100,18$<br>$S^2 = 1,22$<br>$S = 1,10$ |       |            | $\bar{x} = 99,89$<br>$S^2 = 1,37$<br>$S = 1,17$ |       |            |
| $t_{\text{табл}} = 2,57$                         |       |            |   |       |            |
| $t_{\text{расч}} = 0,39$                         |       |            | $t_{\text{расч}} = 0,23$                        |       |            |

Анализируя полученные результаты, представленные в таблице 15, фиксируем: рассчитанные значения  $t$ -критерия Стьюдента не превышают табличного значения, поэтому можно говорить о незначимости ошибки средних результатов двух параллельных исследований.

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что методика количественного определения VMA-13-15 не имеет систематической погрешности, а также характеризуется достаточной прецизионностью (сходимостью).

По разработанной методике проанализированы и статистически обработаны лабораторные образцы VMA-13-15. Полученные данные: содержание БАС в исследуемых образцах находится в пределах 99,8-100,1%, ошибка определения не

превышала 0,5%.

Проведенный валидационный анализ разработанной методики подтверждает, что методика пригодна для количественного определения содержания основного вещества в субстанции VMA-13-15 [76].

По разработанной методике было установлено количественное содержание в стандартном образце *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина, которое составило 99,79%.

#### **4.3. Количественное определение *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом спектрофотометрии в ультрафиолетовой области**

Как указано в разделе 3.3.1.2, исходные растворы для изучения спектров поглощения VMA-13-15 (рисунок 6) были использованы и для построения калибровочных графиков. В качестве исходного раствора использовали 0,1000% раствор в спирте этиловом 96%, в воде очищенной, в хлористоводородной кислоте растворе 0,1 М и натрия гидроксида растворе 0,1 М [44]. Для приготовления растворов использовали методику, описанную в главе 2.

Для построения калибровочных графиков брали соответствующие объемы растворов А и Б (*приложение Г*), помещали в мерные колбы вместимостью 100 мл, доводили соответствующим растворителем до метки. Значения оптических плотностей, полученных при построении калибровочных графиков, были использованы для расчета значений удельных показателей поглощения в максимумах поглощения в различных растворителях (*приложение Г*) [52].

Данные таблиц (*приложение Г*) были использованы для установления границ концентраций, в которых соблюдается основной закон светопоглощения, и расчета характеристик линейной зависимости, а также коэффициента корреляции. Статистически обработанные результаты значений удельных поглощений приведены в таблице 16.

Таблица 16 – Спектральные характеристики *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

| Растворитель       | Длина волны, нм | Уравнение регрессии | R      | Аналитическая область, % | $A_{1\text{см}}^{1\%}$ | $\epsilon$ |
|--------------------|-----------------|---------------------|--------|--------------------------|------------------------|------------|
| 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       |
| NaOH 0,1 М         | 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       |
| HCl 0,1 М          | 227             | $y=903,9x-0,046$    | 0,9954 | 0,0003-0,0009            | 820                    | 2,25       |
|                    | 273             | $y=214,5x-0,020$    | 0,9986 | 0,001-0,004              | 205                    | 1,34       |
| Спирт этиловый 96% | 226             | $y=1681x+0,025$     | 0,9953 | 0,0001-0,0007            | 1734                   | 1,54       |
|                    | 266             | $y=246,7x+0,024$    | 0,9942 | 0,001-0,004              | 259                    | 1,42       |
|                    | 302             | $y=133,3x-0,038$    | 0,9999 | 0,002-0,008              | 124                    | 1,81       |

Как следует из таблицы 16, 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 калибровочных графиков имеют незначительную величину свободного члена, т.е. прямые калибровочных графиков проходят через начало координат. Коэффициент корреляции ( $r$ ) находится в пределах 0,9942-0,9999, следовательно, не превышает значения  $|r| \leq 0,99$ , установленного ГФ РФ. При определении удельного показателя поглощения при интенсивном максимуме его среднее значение оказалось в пределах для высокоинтенсивных максимумов (226 нм) от 819 до 1753, а для низкоинтенсивных (266 нм) от 205 до 259 в зависимости от используемого растворителя.

С целью выбора оптимального растворителя для разработки методики количественного определения VMA-13-15 были использованы рассчитанные относительные погрешности определения значений удельного показателя для каждой длины волны и соответствующего растворителя (таблица 16). 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%. Т.е. относительные погрешности определения свидетельствуют о правильности

выбора растворителя, как воды, так и натрия гидроксида раствора 0,1 М и хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М. Однако с аналитической целью предпочтительнее в качестве растворителя выбрать воду [52]. Анализ зависимости количества молекулярной и ионизированной форм соединения от значения рН среды водных растворов (рисунок 8) свидетельствует о том, что, как кислота, исследуемое вещество при рН 5,5-5,8 находится на 99,9% в молекулярной форме ( $pK_1=11,3$ ), а как основание ( $pK_2=8,77$ ), на 99,9% в ионизированной форме. В то же время молекулярная форма основания ( $pK_3=4,71$ ) находится также в значительном количестве до 90%. Все это позволяет предположить о высоком содержании различных форм соединения в водном растворе, что позволяет измерять оптическую плотность водного раствора с достаточной точностью.

Также в качестве растворителя нами выбран спирт этиловый 96%, так как использование данного растворителя позволит определять содержание VMA-13-15 в твердых дозированных лекарственных препаратах, таких как таблетки и капсулы, у которых вспомогательные вещества не будут растворяться в спирте [52].

В соответствии с требованиями ОФС «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 калибровочного графика и расчет навески проводили исходя из данного значения [17].

Для выбора аналитической длины волны количественное определение БАС проводили при двух длинах волн в максимумах поглощения при 226 нм и 266 нм (методику см. глава 2). Содержание БАС в исследуемых образцах рассчитывали, используя значения оптической плотности раствора условного стандартного образца (глава 2).

Таблица 17 – Результаты спектрофотометрического определения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

| Навеска, г | Спиртовой раствор БАС                     |            |   |            |
|------------|---|------------|---|------------|
|            | 226 нм ( $A_{ст}=0,403$ , $a_{ст}=0,05$ ) |            | 266 нм ( $A_{ст}=0,512$ , $a_{ст}=0,05$ ) |            |
|            | Оптическая плотность                      | Найдено, % | Оптическая плотность                      | Найдено, % |
| 0,0550     | 0,394                                     | 99,25      | 0,501                                     | 99,34      |
| 0,0501     | 0,396                                     | 99,77      | 0,505                                     | 100,13     |
| 0,0490     | 0,395                                     | 99,50      | 0,511                                     | 101,13     |
| 0,0511     | 0,399                                     | 100,51     | 0,504                                     | 99,93      |
| 0,0523     | 0,392                                     | 98,75      | 0,510                                     | 101,12     |
| 0,0552     | 0,400                                     | 100,76     | 0,502                                     | 99,55      |
| Навеска, г | Водный раствор БАС                        |            |   |            |
|            | 226 нм ( $A_{ст}=0,229$ , $a_{ст}=0,05$ ) |            | 266 нм ( $A_{ст}=0,431$ , $a_{ст}=0,05$ ) |            |
|            | Оптическая плотность                      | Найдено, % | Оптическая плотность                      | Найдено, % |
| 0,0515     | 0,223                                     | 98,89      | 0,431                                     | 101,35     |
| 0,0489     | 0,225                                     | 99,74      | 0,429                                     | 100,58     |
| 0,0553     | 0,229                                     | 101,52     | 0,423                                     | 99,17      |
| 0,0507     | 0,228                                     | 101,07     | 0,427                                     | 100,11     |
| 0,0499     | 0,227                                     | 100,63     | 0,425                                     | 99,64      |
| 0,0541     | 0,226                                     | 100,19     | 0,438                                     | 101,56     |

С целью получения метрологической характеристики метода проводили статистическую обработку двух выборок результатов (таблицы 18 и 19).

Таблица 18 – Метрологические характеристики количественного определения спиртового раствора *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

| $N_0$      | $n$ | $f$ | $\bar{x}, \%$ | $S^2$  | $S$    | $S\bar{x}$ | $P, \%$ | $t(P, f)$ | $t$   | $\Delta\bar{x}$ | $\epsilon, \%$ |
|------------|-----|-----|---------------|--------|--------|------------|---------|-----------|-------|-----------------|----------------|
| 1 (226 нм) | 6   | 5   | 99,76         | 0,5820 | 0,7629 | 0,3115     | 95      | 2,57      | 0,767 | 0,8005          | 0,80           |
| 2 (266 нм) | 6   | 5   | 100,26        | 1,1423 | 1,0688 | 0,6343     | 95      | 2,57      | 0,598 | 1,1213          | 1,12           |

Таблица 19 – Метрологические характеристики количественного определения водного раствора *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

| $N_0$      | $n$ | $F$ | $\bar{x}, \%$ | $S^2$ | $S$   | $S\bar{x}$ | $P, \%$ | $t(P, f)$ | $t$   | $\Delta\bar{x}$ | $\epsilon, \%$ |
|------------|-----|-----|---------------|-------|-------|------------|---------|-----------|-------|-----------------|----------------|
| 1 (226 нм) | 6   | 5   | 100,34        | 0,900 | 0,948 | 0,387      | 95      | 2,57      | 0,875 | 0,99            | 1,09           |
| 2 (266 нм) | 6   | 5   | 100,57        | 1,114 | 1,055 | 0,430      | 95      | 2,57      | 1,31  | 1,30            | 1,28           |

Для оценки значимости различий использовали *t*-критерий Стьюдента, рассчитываемый как разность средних значений, поделенная на корень из суммы квадратов ошибок [17]. Так как рассчитанные значения критерия (таблица 18) оказались меньше критического, можно сделать вывод о том, что наблюдаемые

различия статистически незначимы (уровень значимости  $p < 0,05$ ). Т.е. в анализе БАС при применении в качестве растворителя спирта этилового 96% можно использовать в качестве аналитической длины волны оба максимума поглощения. В водном растворе БАС также наблюдаются статистически незначимые различия (таблица 19), что также позволяет использовать обе длины волны для количественного определения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил-гуанидина [52].

Однако для высокоинтенсивного максимума необходимо использование дополнительного разведения, что усложняет методику анализа. В связи с этим спектрофотометрический анализ субстанции целесообразнее проводить в максимуме поглощения 266 нм как для водных растворов БАС, так и для спиртовых.

Полученные данные подтверждают, что методика может быть рекомендована для количественного определения БАС методом УФ-спектрофотометрии.

#### **4.3.1. Валидация методик количественного определения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом спектрофотометрии в ультрафиолетовой области**

Важным критерием оценки аналитической методики служит доказательство ее валидности, включающей следующие валидационные характеристики: специфичность, линейность, прецизионность и правильность. Данные характеристики определяли как для водного, так и для спиртового растворов *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил-гуанидина [50].

Специфичность методики подтверждали соответствием положения максимумов растворов исследуемого БАС и УСО.

Валидационный параметр «линейность» проверяли экспериментально измерением аналитического сигнала для проб с различным содержанием исследуемой субстанции (таблица 16, приложение Б, таблица 2).

Прецизионность методики оценивалась в двух вариантах: повторяемость (сходимость) и внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность, при этом критерием приемлемости служило значение относительного стандартного отклонения (RSD) менее 2% [17,118].

Проверку прецизионности (на уровне сходимости) проводили по 6 параллельным определениям, которые выполнялись в одних и тех же условиях: в одной лаборатории на одном приборе в течение короткого промежутка времени по методике, описанной в главе 2. Затем рассчитывали величины стандартного отклонения (S) и относительного стандартного отклонения (RSD).

Таблица 20 – Результаты валидационной оценки спиртового раствора *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина по показателю «повторяемость» (сходимость) ( $A_{ст}=0,512$ ,  $a_{ст}=0,0500$  г)

| Навеска, г | $A_x$ | Найдено, % | Метрологические характеристики   |
|------------|-------|------------|--|
| 0,0515     | 0,502 | 99,53      | $\bar{x}=99,79$<br>$S=1,40$<br>$RSD\bar{x}=1,40\%$<br>$\Delta\bar{x}=1,47$<br>$\varepsilon=1,47\%$ |
| 0,0489     | 0,495 | 98,15      |  |
| 0,0553     | 0,506 | 100,33     |  |
| 0,0507     | 0,511 | 101,32     |  |
| 0,0499     | 0,497 | 98,54      |  |
| 0,0541     | 0,509 | 101,52     |  |

Таблица 21 – Результаты валидационной оценки водного раствора *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина по показателю «повторяемость» (сходимость) ( $A_{ст}=0,431$ ,  $a_{ст}=0,0500$  г)

| Навеска, г | $A_x$ | Найдено, % | Метрологические характеристики  |
|------------|-------|------------|---|
| 0,0560     | 0,425 | 99,64      | $\bar{x}=100,11$<br>$S=1,29$<br>$RSD\bar{x}=1,29\%$<br>$\Delta\bar{x}=1,36$<br>$\varepsilon=1,36\%$ |
| 0,0481     | 0,421 | 98,70      |   |
| 0,0552     | 0,427 | 100,11     |   |
| 0,0571     | 0,432 | 101,28     |   |
| 0,0510     | 0,422 | 98,94      |   |
| 0,0501     | 0,435 | 101,99     |   |

Полученный результат относительного стандартного отклонения не превышает 2%, т.е. методика приемлема для анализа исследуемого БАС при использовании обоих выбранных растворителей [105].

Внутрилабораторную прецизионность методики оценивали путем определения количественного содержания субстанции в пределах одной лаборатории на спектрофотометре СФ-2000 в разные дни [6].

Таблица 22 – Результаты валидационной оценки водного раствора *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина по показателю внутрилабораторная прецизионность ( $A_{ст}=0,431$ ,  $a_{ст}=0,0500$  г)

| 1-й день анализа                           |       |            | 2-й день анализа                           |       |            |
|--|-------|------------|--|-------|------------|
| Навеска, г                                 | $A_x$ | Найдено, % | Навеска, г                                 | $A_x$ | Найдено, % |
| 0,0550                                     | 0,426 | 99,88      | 0,0515                                     | 0,431 | 101,35     |
| 0,0501                                     | 0,423 | 99,17      | 0,0489                                     | 0,429 | 100,58     |
| 0,0490                                     | 0,429 | 100,58     | 0,0553                                     | 0,423 | 99,17      |
| 0,0511                                     | 0,431 | 101,52     | 0,0507                                     | 0,427 | 100,11     |
| 0,0523                                     | 0,422 | 98,94      | 0,0499                                     | 0,425 | 99,64      |
| 0,0552                                     | 0,436 | 102,52     | 0,0541                                     | 0,438 | 102,56     |
| Метрологические характеристики             |       |            |  |       |            |
| $\bar{x}=100,43$<br>$S^2=1,93$<br>$S=1,39$ |       |            | $\bar{x}=100,56$<br>$S^2=1,52$<br>$S=1,23$ |       |            |
| $t(P,f)=2,57$                              |       |            |  |       |            |
| $t=0,702$                                  |       |            | $t=1,11$                                   |       |            |

Таблица 23 – Результаты валидационной оценки спиртового раствора *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина по показателю «внутрилабораторная прецизионность» ( $A_{ст}=0,512$ ,  $a_{ст}=0,0500$  г)

| 1-й день анализа                          |       |            | 2-й день анализа                           |       |            |
|---|-------|------------|--|-------|------------|
| Навеска, г                                | $A_x$ | Найдено, % | Навеска, г                                 | $A_x$ | Найдено, % |
| 0,0515                                    | 0,502 | 99,53      | 0,0560                                     | 0,513 | 101,72     |
| 0,0489                                    | 0,495 | 98,15      | 0,0481                                     | 0,506 | 100,33     |
| 0,0553                                    | 0,506 | 100,33     | 0,0552                                     | 0,504 | 99,93      |
| 0,0507                                    | 0,511 | 101,32     | 0,0571                                     | 0,518 | 102,71     |
| 0,0499                                    | 0,497 | 98,54      | 0,0510                                     | 0,505 | 100,13     |
| 0,0541                                    | 0,509 | 101,52     | 0,0501                                     | 0,502 | 99,53      |
| Метрологические характеристики            |       |            |  |       |            |
| $\bar{x}=99,79$<br>$S^2=1,97$<br>$S=1,40$ |       |            | $\bar{x}=100,72$<br>$S^2=1,50$<br>$S=1,22$ |       |            |
| $t(P,f)=2,57$                             |       |            |  |       |            |
| $t=0,360$                                 |       |            | $t=1,44$                                   |       |            |

Исходя из данных таблиц 22 и 23, рассчитанные значения критерия Стьюдента не превышают табличного, поэтому можно сделать вывод о незначимости средних результатов двух выполненных исследований, что позволяет утверждать, что аналитическая методика количественного определения характеризуется внутрилабораторной прецизионностью.

Правильность методики подтверждали анализом на трех уровнях анализируемых концентраций, соответствующих 80, 100, 120 % номинального

содержания. На каждом уровне проводили по 3 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  $\bar{R}$ , равное 100,11, находятся в пределах 98-102% при значении  $RSD\bar{x}$  равным 1,3%, что является доказательством валидности методики по показателю «правильность».

Таблица 24 – Результаты оценки правильности методики количественного определения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

| Спирт этиловый 96%, $a_{cm}=0,0500$ г           |       |       |          |            |        | Вода очищенная, $a_{cm}=0,0500$ г                |       |       |          |            |        |
|---|-------|-------|----------|------------|--------|--|-------|-------|----------|------------|--------|
|   | V, мл | $A_x$ | $A_{ст}$ | Найдено, % | R, %   |  | V, мл | $A_x$ | $A_{ст}$ | Найдено, % | R, %   |
| 1   | 1,5   | 0,419 | 0,425    | 101,04     | 101,04 | 1  | 1,5   | 0,325 | 0,332    | 99,38      | 99,38  |
| 1   | 1,5   | 0,415 |          | 100,07     | 100,07 | 1  | 1,5   | 0,328 |          | 100,29     | 100,29 |
| 1   | 1,5   | 0,410 |          | 98,87      | 98,87  | 1  | 1,5   | 0,330 |          | 100,91     | 100,91 |
| 2   | 2,0   | 0,505 | 0,512    | 100,13     | 100,13 | 2  | 2,0   | 0,429 | 0,431    | 100,58     | 100,58 |
| 2   | 2,0   | 0,515 |          | 101,11     | 101,11 | 2  | 2,0   | 0,423 |          | 99,17      | 99,17  |
| 2   | 2,0   | 0,503 |          | 99,73      | 99,73  | 2  | 2,0   | 0,427 |          | 100,11     | 100,11 |
| 3   | 2,5   | 0,634 | 0,641    | 101,20     | 101,20 | 3  | 2,5   | 0,535 | 0,542    | 100,21     | 100,21 |
| 3   | 2,5   | 0,639 |          | 102,00     | 102,00 | 3  | 2,5   | 0,538 |          | 100,77     | 100,77 |
| 3   | 2,5   | 0,629 |          | 100,40     | 100,40 | 3  | 2,5   | 0,539 |          | 101,14     | 101,14 |
| <b>Метрологические характеристики</b>           |       |       |          |            |        |  |       |       |          |            |        |
| $\bar{R}=100,39$ ; $S=1,3$ ; $RSD\bar{x}=1,3\%$ |       |       |          |            |        | $\bar{R}=100,28$ ; $S=0,66$ ; $RSD\bar{x}=0,7\%$ |       |       |          |            |        |

Полученные результаты (таблица 24) свидетельствуют, что значения открываемости находятся в пределах 98-102%, при значении  $RSD\bar{x}$  равном 1,3%, что является признаком валидности по данному показателю [17].

Проведенная валидационная оценка позволяет утверждать, что методика валидна по всем показателям и может быть включена в НД для количественного определения БАС.

В оптимальных условиях по методике (глава 2) были проанализированы 3 лабораторных образца.

Таблица 25 – Результаты проверки разработанной методики на лабораторных образцах субстанции *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

| Спиртовой раствор VMA-13-15 ( $A_{ст}=0,512$ , $a_{см}=0,0500$ г)                                    |       |         |   |       |         |   |       |         |
|--|-------|---------|---|-------|---------|---|-------|---------|
| Серия 2017   |       |         | Серия 2019  |       |         | Серия 2021  |       |         |
| Навеска, г   | $A_x$ | $x$ , % | Навеска, г  | $A_x$ | $x$ , % | Навеска, г  | $A_x$ | $x$ , % |
| 0,0499   | 0,501 | 99,34   | 0,0515  | 0,502 | 99,53   | 0,0550  | 0,498 | 98,74   |
| 0,0520   | 0,505 | 100,13  | 0,0489  | 0,501 | 99,34   | 0,0501  | 0,505 | 100,13  |
| 0,0502   | 0,503 | 99,73   | 0,0553  | 0,506 | 100,33  | 0,0490  | 0,506 | 100,33  |
| 0,0565   | 0,504 | 99,93   | 0,0507  | 0,511 | 101,32  | 0,0511  | 0,501 | 99,34   |
| 0,0513   | 0,499 | 99,05   | 0,0499  | 0,504 | 99,93   | 0,0523  | 0,515 | 101,11  |
| 0,0563   | 0,510 | 101,12  | 0,0541  | 0,507 | 100,52  | 0,0552  | 0,503 | 99,73   |
| Метрологические характеристики   |       |         |   |       |         |   |       |         |
| $\bar{x}=99,88\%$<br>$S=0,72$<br>$RSD\bar{x}=0,72\%$<br>$\Delta\bar{x}=0,75$<br>$\varepsilon=0,75\%$ |       |         | $\bar{x}=100,16\%$<br>$S=0,72$<br>$RSD\bar{x}=0,73\%$<br>$\Delta\bar{x}=0,76$<br>$\varepsilon=0,75\%$ |       |         | $\bar{x}=99,89\%$<br>$S=0,82$<br>$RSD\bar{x}=0,83\%$<br>$\Delta\bar{x}=0,86$<br>$\varepsilon=0,86\%$  |       |         |
| Водный раствор VMA-13-15 ( $A_{ст}=0,431$ , $a_{см}=0,0500$ г)                                       |       |         |   |       |         |   |       |         |
| Серия 2017   |       |         | Серия 2019  |       |         | Серия 2021  |       |         |
| Навеска, г   | $A_x$ | $x$ , % | Навеска, г  | $A_x$ | $x$ , % | Навеска, г  | $A_x$ | $x$ , % |
| 0,0550   | 0,426 | 99,88   | 0,0560  | 0,425 | 99,64   | 0,0499  | 0,427 | 100,11  |
| 0,0501   | 0,423 | 99,17   | 0,0481  | 0,421 | 98,70   | 0,0520  | 0,431 | 101,05  |
| 0,0490   | 0,429 | 100,58  | 0,0552  | 0,427 | 100,11  | 0,0502  | 0,428 | 100,35  |
| 0,0511   | 0,425 | 99,64   | 0,0571  | 0,432 | 101,28  | 0,0565  | 0,423 | 99,17   |
| 0,0523   | 0,422 | 98,94   | 0,0510  | 0,422 | 98,94   | 0,0513  | 0,432 | 101,28  |
| 0,0552   | 0,431 | 100,35  | 0,0501  | 0,426 | 99,88   | 0,0563  | 0,426 | 99,88   |
| Метрологические характеристики   |       |         |   |       |         |   |       |         |
| $\bar{x}=99,76\%$<br>$S=0,64$<br>$RSD\bar{x}=0,65\%$<br>$\Delta\bar{x}=0,67$<br>$\varepsilon=0,67\%$ |       |         | $\bar{x}=99,75\%$<br>$S=0,92$<br>$RSD\bar{x}=0,93\%$<br>$\Delta\bar{x}=0,97$<br>$\varepsilon=0,97\%$  |       |         | $\bar{x}=100,30\%$<br>$S=0,77$<br>$RSD\bar{x}=0,78\%$<br>$\Delta\bar{x}=0,81$<br>$\varepsilon=0,81\%$ |       |         |

Как следует из таблицы 25, содержание субстанции в исследуемых трех сериях образцов находится в пределах 99-101%.

В результате исследований установлено, что метод УФ-спектрофотометрии позволяет получить надежные результаты и может быть использован для количественного определения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина.

## Заключение по главе 4

1. Определены с помощью электронного ресурса [chemicalize.com](http://chemicalize.com) константы ионизации (pKa) *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина. Установлено, что исследуемая субстанция имеет константу как кислоты  $pK_1=11,3$  и как основания 2 константы  $pK_3=4,71$  и  $pK_2=8,77$ . Рассчитанные константы подтверждали с помощью потенциометрического титрования с использованием в качестве титранта натрия гидроксида раствор 0,1 М и хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М. Полученные значения pKa свидетельствуют о наличии амфотерных свойств *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина.

2. Изучена возможность кислотно-основного титрования субстанции как в водных и спиртовых средах, так и с использованием протогенных и протофильных растворителей. Обоснован выбор в качестве растворителя раствора уксусной кислоты ледяной. Разработана и валидирована по основным валидационным характеристикам методика количественного определения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина титриметрическим методом с установлением точки эквивалентности с помощью потенциометра. Предложенная методика позволила определить количественное содержание БАС в пределах 99,0-101,0%.

3. Установлены основные спектральные характеристики для водного, спиртового, щелочного и кислого раствора *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина. Обоснован выбор оптимального растворителя и длины волны для разработки методики количественного определения с помощью метода УФ-спектрофотометрии. Разработана методика определения количественного содержания с использованием в качестве растворителя воды очищенной и спирта этилового 96%. Проведенная валидационная оценка доказывает, что методика валидна по всем основным валидационным показателям. Установлено количественное содержание *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина – 99,0-101,0%.

## ГЛАВА 5. ПРИМЕНЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ АНАЛИЗА *N*-[2-[4-ОКСО-3(4*H*)-ХИНАЗОЛИНИЛ]ПРОПИОНИЛ]- ГУАНИДИНА

### 5.1. Определение *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом капиллярного электрофореза

В настоящее время метод капиллярного электрофореза является одним из перспективных и высокоэффективных методов разделения и анализа лекарственных средств в фармацевтическом производстве ввиду относительной простоты использования и получения надежных результатов [23].

Для разработки методик идентификации и количественного определения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина как в субстанции, так и в потенциальных лекарственных препаратах в качестве альтернативного метода был выбран метод капиллярного электрофореза.

Выбор буферного раствора и исходных параметров прибора осуществляли, исходя из физико-химических свойств субстанции и анализа литературных источников [78,94]. В качестве электролита использовали боратный буферный раствор 0,01 М с рН 9,2±0,02, приготовленный согласно ГОСТ 4919.2-2016 «Реактивы и особо чистые вещества» [42].

Подготовленные для предварительных исследований пробы испытуемого образца (глава 2) вводили в систему капиллярного электрофореза «Капель – 105м» (ОАО «Люмэкс-маркетинг», Россия) при условиях анализа, описанных в таблице 26.

Таблица 26 – Условия анализа для определения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом капиллярного электрофореза

| Показатель    | Условия анализа   |
|---------------|-------------------|
| Буфер         | Боратный (рН 9,2) |
| Температура   | +20°C             |
| Напряжение    | +20кВ             |
| Время анализа | 10 мин            |

## Продолжение Таблицы 26

|                           |                                 |
|---------------------------|---------------------------------|
| Длина волны               | 268 нм                          |
| Капилляр кварцевый, длина | 60 см (эффективная длина 50 см) |
| Диаметр                   | 75 мкм                          |
| Ввод пробы                | Гидродинамически, 30 мбар       |

Выбранные условия определения (таблица 26) оказались пригодными для анализа *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина, так как на электрофореграмме условного стандартного образца с концентрацией раствора 0,0310 мг/мл (рисунок 12) четко виден симметричный пик с оптимальным временем миграции в пределах 7 минут. Электрофореграмма образца БАС выглядит аналогично (рисунок 13). Характеристики электрофореграмм представлены в таблице 28 [42].

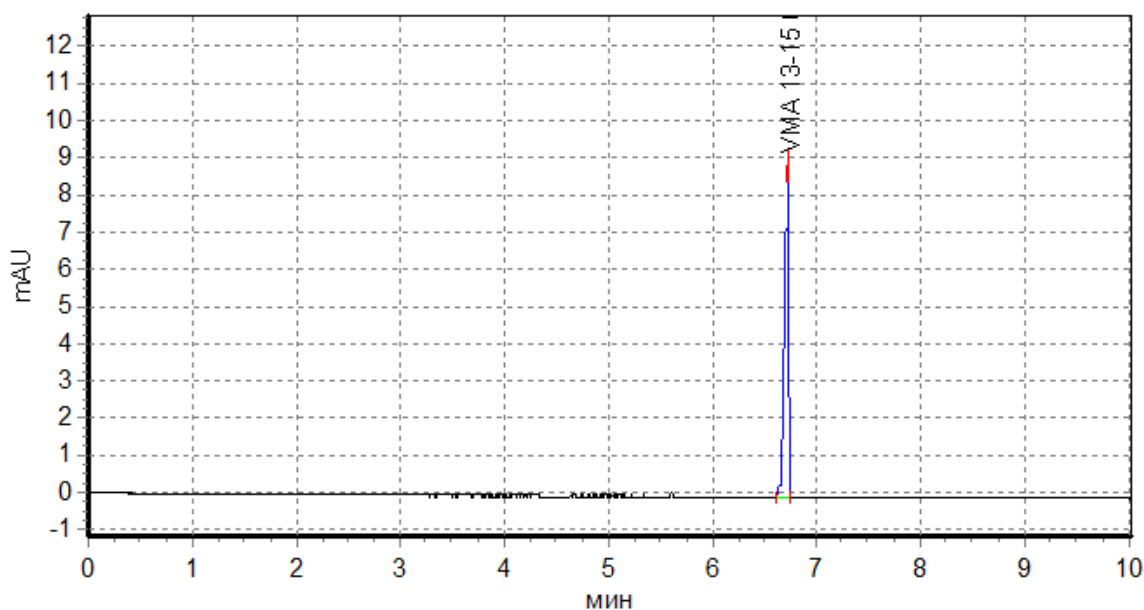


Рисунок 12 – Электрофореграмма условного стандартного образца *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

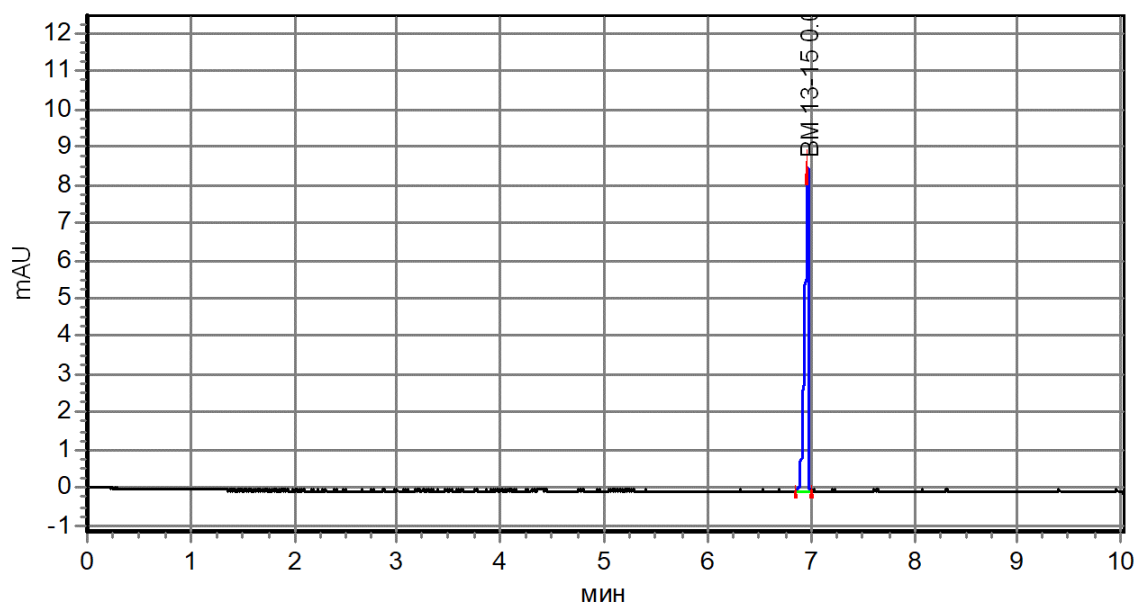


Рисунок 13 – Электрофореграмма лабораторного образца N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

Характеристики, полученные при анализе испытуемого образца и образца УСО, отличаются не более чем на 5% (таблица 27).

Таблица 27 – Характеристики лабораторного и условного стандартного образцов N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

| Показатель  | Испытуемый образец | УСО    | Отклонения, % |
|-------------|--------------------|--------|---------------|
| $t$ , мин   | 6,985              | 6,723  | 3,8           |
| Высота, mAU | 8,535              | 8,927  | 4,3           |
| Начало, мин | 6,862              | 6,600  | 3,9           |
| Конец, мин  | 7,023              | 6,755  | 3,9           |
| Площадь     | 223,8              | 228,9  | 2,2           |
| $W_{0,5}$   | 0,040              | 0,039  | 2,5           |
| $N$         | 168636             | 170422 | 0,9           |
| $A_s$       | 0,0                | 0,2    | 0             |

На основании выбранных условий была предложена методика количественного определения БАС методом капиллярного электрофореза (глава 2). Кроме того, представленные в таблице 27 данные могут послужить основанием для возможности идентификации исследуемого вещества, а также для оценки пригодности выбранной хроматографической системы. С этой целью в соответствии с требованиями ОФС.1.2.1.0022.15 «Капиллярный электрофорез» были статистически обработаны и получены значения относительного

стандартного отклонения для 5 параллельных определений УСО ( $a=0,0155$  г) испытуемого соединения для времени миграции, кажущегося числа теоретических тарелок и площади пика (таблица 28). Относительная ошибка определения времени миграции, площади пика и эффективности не превышает 3% [42].

Таблица 28 – Результаты определения пригодности хроматографической системы для метода капиллярного электрофореза

| № опыта   | Время миграции, мин | Кажущееся число теоретических тарелок | Площадь пика |
|-----------|---------------------|---------------------------------------|--------------|
| 1         | 7,000               | 169663                                | 226,9        |
| 2         | 6,985               | 168936                                | 223,8        |
| 3         | 6,773               | 170422                                | 228,5        |
| 4         | 6,970               | 183156                                | 222,8        |
| 5         | 6,723               | 170422                                | 229,2        |
| $\bar{x}$ | 6,89                | 172520                                | 226,2        |
| DS        | 0,11                | 5346                                  | 2,53         |
| RDS       | 1,59                | 3,0                                   | 1,11         |

На основании полученных данных хроматографическая система будет считаться пригодной, если выполняются условия, приведенные в таблице 29.

Таблица 29 – Пригодность хроматографической системы

| Показатель   | Значение   |
|--|--|
| Эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику | Кажущееся число теоретических тарелок не менее 150 000 |
| Относительное стандартное отклонение времени миграции          | Не превышает 5%  |
| Относительное стандартное отклонение площади пика              | Не превышает 5%  |

Таким образом, разработанную методику можно рекомендовать для идентификации БАС, полагая, что время миграции пика на электрофореграмме раствора испытуемого образца должно соответствовать времени миграции пика на электрофореграмме раствора условного стандартного образца [42].

### 5.1.1. Валидационная оценка пригодности разработанной методики определения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом капиллярного электрофореза

Важным критерием оценки методики количественного определения служит доказательство ее пригодности, включающей следующие валидационные характеристики: специфичность, линейность, прецизионность и правильность.

Из результатов, представленных в таблице 29, следует, что значения основных параметров полученных пиков, такие как время миграции, ШПВ, кажущееся число теоретических тарелок и фактор симметричности пика почти идентичны (полученные значения отличаются друг от друга не более чем на 5%), что свидетельствует о специфичности методики.

Для оценки линейности изучали зависимость значений площадей пиков от концентрации пробы, полученных по методике пробоподготовки. Калибровочный график представлен на рисунке 14 [42].

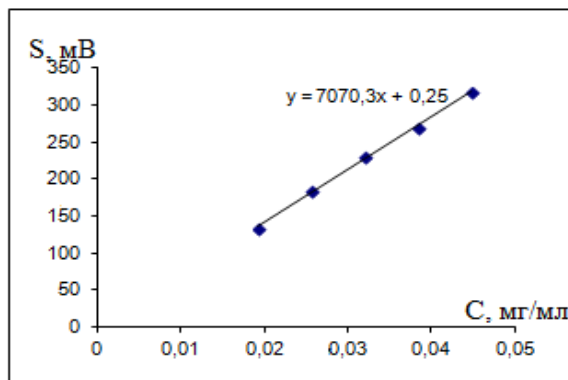


Рисунок 14 – Калибровочный график линейной зависимости площади пиков от концентрации *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

Таблица 30 – Результаты определения линейной зависимости площадей пика от концентрации *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

| Концентрация, мг/мл | Площадь пика | Параметры линейной зависимости |                  |
|---------------------|--------------|--------------------------------|------------------|
| 0,0448              | 316,6        | $b=7070,3$                     | $a=0,25$         |
| 0,0384              | 268,5        | $S_b=193,72$                   | $S_a=6,44$       |
| 0,0320              | 231,1        | $\Delta b=616,51$              | $\Delta a=20,50$ |
| 0,0256              | 183,4        | $r=0,9977$                     |                  |
| 0,0192              | 132,9        |                                |                  |

Полученные значения площади пиков находятся в линейной зависимости (таблица 30) от концентрации взятой пробы. Коэффициент корреляции  $r=0,9977$  соответствует требованиям ОФС.1.1.0012 ( $r \leq 0,99$ ) [17]. Таким образом, методика по критерию «линейность» валидна и может быть рекомендована для количественного определения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина в аналитической области концентраций от 0,01 до 0,05 мг/мл [42].

В соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012 на этапе разработки оригинальной методики достаточно определять повторяемость (сходимость) результатов, получаемых с ее использованием [17]. Для анализа использовали предлагаемую методику (глава 2) и испытуемый образец с потерей массы при высушивании 0,5% (таблица 31).

Таблица 31 – Результаты повторяемости (сходимости) определения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом капиллярного электрофореза ( $a_{cm}=0,0500$  г;  $S_{ct}=179,8$ )

| Навеска, г | S     | Найдено, % | Метрологические характеристики   |
|------------|-------|------------|--|
| 0,0502     | 177,1 | 98,48      | $\bar{x}=99,63$<br>$S=1,31$<br>$RSD\bar{x}=1,31\%$<br>$S_{\bar{x}}=0,53$<br>$\varepsilon=1,39\%$ |
| 0,0501     | 182,2 | 99,86      |  |
| 0,0498     | 187,4 | 100,75     |  |
| 0,0500     | 177,8 | 99,02      |  |
| 0,0499     | 181,6 | 101,51     |  |
| 0,0497     | 175,6 | 98,16      |  |

Установлено, что относительное стандартное отклонение составляет 1,31%, что свидетельствует о достаточно высокой сходимости результатов количественного определения. Относительная погрешность определения не превышает значения -1,39% [42].

При тестировании методики по критерию «правильность» применяли значение свободного члена, полученного из уравнения регрессии. Известно, если свободный член в уравнении статистически достоверно не отличается от нуля, то при использовании такой методики результаты не имеют систематической ошибки. Из полученных результатов статистической обработки уравнения коэффициент «*b*» имеет доверительный интервал 616,51 ( $7070,3x \pm 616,51$ ), а свободный член «*a*» значимо не отличается от нуля, потому что его

доверительный интервал равен 20,50 ( $0,25 \pm 20,50$ ) и значительно превышает значение коэффициента. Из-за того, что свободный член « $a$ » = 0, уравнение принимает вид  $y=7070,3x$ , и предлагаемая нами методика не отягощена систематической погрешностью.

Разработанная методика определения нового кардиопротективного средства с помощью капиллярного электрофореза может быть рекомендована для включения в проект нормативной документации как альтернативный метод для идентификации и количественного определения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина как в субстанции, так и в потенциальных лекарственных препаратах. Выбранные условия проведения анализа могут также служить основой для изучения устойчивости исследуемой БАС при хранении [42].

## **5.2. Разработка и валидация методики определения родственных примесей *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом капиллярного электрофореза**

В соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ 15 издания одним из основных критериев контроля качества фармацевтических субстанций является показатель «Родственные примеси» [17].

Исходя из схемы синтеза и структуры анализируемой субстанции в качестве технологической примеси, можно предположить наличие исходного соединения – незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она, из-за возможной неполноты протекания реакции. Данная примесь относится к идентифицированным примесям, так как известно ее химическое строение [84].

Для оценки чистоты *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина была разработана методика анализа родственных примесей методом капиллярного электрофореза. Для проведения анализа были выбраны капиллярно-электрофоретические условия, предложенные нами для определения БАС VMA-13-15: гидродинамический ввод пробы, 30 мбар, электрофоретическое разделение

с боратным буфером (рН 9,2, прилагаемое напряжение +20кВ), спектрофотометрическое детектирование пиков при длине волны 254 нм, время проведения анализа 15 минут [84].

Идентификация и пределы контроля родственных примесей для фармацевтических субстанций зависят от максимальной суточной дозы лекарственного средства. По предварительным данным рекомендуемая разовая доза будет находиться в пределах 50 мг, поэтому мы посчитали возможным определять содержание родственной примеси в пределах 0,1%.

Пригодность предложенной методики устанавливали по следующим параметрам: специфичность, линейность, прецизионность и правильность, предел обнаружения и предел количественного определения.

Специфичность методики подтверждали, вводя в хроматографическую систему приготовленные растворы примеси незамещенного хиназолин-4(3H)-она и модельной смеси. Полученные электрофореграммы представлены на рисунках 15 и 16 [84].

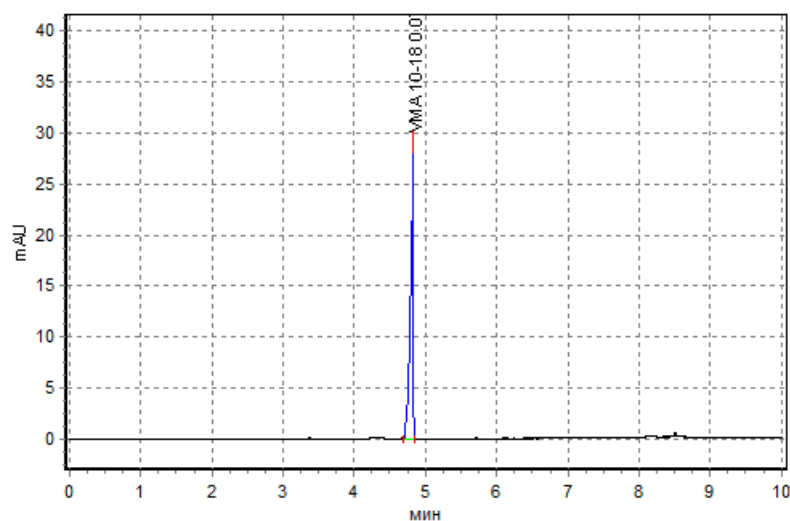


Рисунок 15 – Электрофореграмма незамещенного хиназолин-4(3H)-она

На электрофореграмме (рисунок 15) получен симметричный пик со временем миграции в пределах 4,8 минут, что является оптимальным для экспресс-анализа. На электрофореграмме модельной смеси (рисунок 16)

установлено четкое разделение пиков анализируемых веществ, а именно пика примеси со временем миграции 4,37 мин и пика исследуемого вещества, со временем миграции 6,59 мин [84].

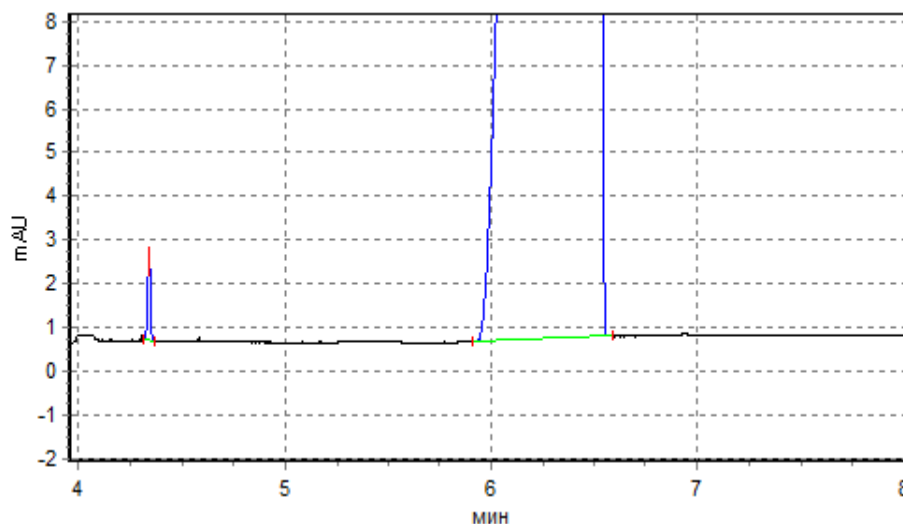


Рисунок 16 – Электрофореграмма модельной смеси

Нами оценены следующие параметры предлагаемой методики (глава 2): время миграции, разрешение между пиками ( $R_s$ ), фактор симметричности пика ( $A_s$ ), кажущееся число теоретических тарелок ( $N$ ), относительное стандартное отклонение площадей пиков ( $RSD$ , %), значения которых рассчитаны по результатам 6 электрофореграмм с использованием программного обеспечения «Эльфран» (таблица 32).

Таблица 32 – Параметры пригодности хроматографической системы

| Вещество           | Время миграции, мин | $R_s$ | $A_s$ | $N$    | $RSD$ , % |
|--------------------|---------------------|-------|-------|--------|-----------|
| Хиназолин-4(3H)-он | 4,37                | 5,8   | 0,2   | 160329 | 1,47      |
| VMA-13-15          | 6,59                |       | 0,1   | 102974 | 1,07      |

Полученные данные таблицы 33 свидетельствуют о пригодности используемой хроматографической системы, так как разрешение между пиками ( $R_s$ ) примеси незамещенного хиназолин-4(3H)-она и УСО *N*-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина составило 5,8, что говорит о достаточном разделении пика основной субстанции и ее примеси (рекомендуемое значение  $R_s$

при определении содержания примесей  $\geq 2$ ). Относительное стандартное отклонение (RSD) площадей пиков на 6 электрофореграммах примеси и УСО БАС составило не более 2%. Кажущееся число теоретических тарелок также укладывается в требуемый показатель  $\geq 1500$  [84].

Линейность методики устанавливали при анализе растворов пяти концентраций незамещенного хиназолин-4(3H)-она (0,05; 0,1; 0,15; 0,2 и 0,25%) от содержания *N*-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина. Полученные растворы анализировали в трех повторностях, затем рассчитывали средние значения площадей пиков и строили график зависимости площади пика от концентрации примеси в растворе (рисунок 17). В таблице 34 приведены результаты установленной линейной зависимости.

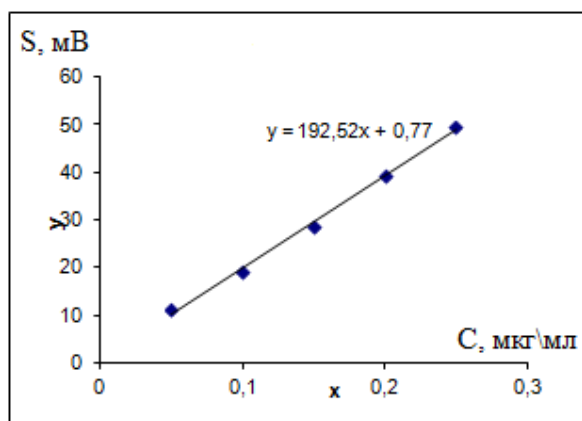


Рисунок 17 – Калибровочный график линейной зависимости площади пиков от концентрации хиназолин-4(3H)-она

Таблица 33 – Результаты определения линейной зависимости площадей пика от концентрации хиназолин-4(3H)-она

| Концентрация примеси, мкг/мл | Количество примеси, % от содержания VMA-13-15 | Площадь пика | Параметры линейной зависимости |                 |
|------------------------------|---|--------------|--------------------------------|-----------------|
| 1                            | 0,05  | 11,36        | $b=192,52$                     | $a=0,77$        |
| 2                            | 0,10  | 19,35        | $S_b=5,91$                     | $S_a=0,98$      |
| 3                            | 0,15  | 28,73        | $\Delta b=18,81$               | $\Delta a=3,11$ |
| 4                            | 0,20  | 39,27        | $r=0,9971$                     |                 |
| 5                            | 0,25  | 49,53        |                                |                 |

Из полученных данных таблицы следует, что методика соответствует параметру «линейность». Полученные результаты использовали для расчета

предела обнаружения (ПО) и предела количественного определения (ПКО):

$$\text{ПО} = 0,016 \text{ мкг/мл}, \text{ ПКО} = 0,050 \text{ мкг/мл}$$

Аналитической областью методик испытаний на чистоту является диапазон 50-120%, то есть при определении незамещенного хиназолин-4(3H)-она эти значения должны находиться в пределах от 0,05 до 0,25 %.

Параметр «прецизионность» устанавливали для первого уровня – повторяемости (сходимость). Для определения прецизионности готовили растворы Б (глава 2) в 6 повторностях (таблица 34) [84].

Таблица 34 – Результаты определения повторяемости (сходимости) методики определения примеси незамещенного хиназолин-4(3H)-она в модельных смесях (S<sub>ст</sub>-19,31)

| Взято, кг/мл | Найдено в пробе, мкг/мл | Площадь пика | Найдено, % | Метрологические характеристики  |
|--------------|-------------------------|--------------|------------|---|
| 2            | 2,014                   | 19,44        | 0,1006     | $\bar{x} = 0,0998$<br>$S = 1,31$<br>$RSD\bar{x} = 1,31\%$<br>$S_{\bar{x}} = 0,53$<br>$\varepsilon = 1,09\%$ |
| 2            | 1,991                   | 19,23        | 0,0995     |   |
| 2            | 2,009                   | 19,40        | 0,1004     |   |
| 2            | 1,966                   | 18,99        | 0,0983     |   |
| 2            | 2,021                   | 19,52        | 0,1010     |   |
| 2            | 1,980                   | 19,12        | 0,0990     |   |

Как следует из данных таблицы 34, методика количественного определения примеси незамещенного хиназолин-4(3H)-она соответствует параметру «прецизионность», так как не превышает установленных значений [105].

Правильность методики оценивали при анализе растворов (глава 2) на трех уровнях концентраций незамещенного хиназолин-4(3H)-она от содержания VMA-13-15 в трех повторностях. Результаты представлены в таблице 35.

Таблица 35 – Результаты установления правильности методики определения примеси незамещенного хиназолин-4(3H)-она в модельных смесях

| Уровень | Взято, мкг/мл | Площадь пика, мВ | Найдено, мкг/мл | R, %   | Метрологические характеристики  |
|---------|---------------|------------------|-----------------|--------|---|
| 1       | 1             | 9,52             | 0,974           | 97,40  | $\bar{R} = 99,79$<br>$S = 2,57$<br>$RSD\bar{x} = 2,58\%$<br>$t_{\text{exp}} = 0,23$<br>$t_{\text{табл}} = 2,31$ |
|         |               | 9,84             | 1,007           | 100,71 |   |
|         |               | 10,11            | 1,036           | 103,60 |   |
| 2       | 2             | 19,44            | 2,014           | 100,10 |   |
|         |               | 19,40            | 2,009           | 99,85  |   |
|         |               | 19,23            | 1,991           | 98,95  |   |

Продолжение Таблицы 35

|   |   |       |       |        |  |
|---|---|-------|-------|--------|--|
| 3 | 3 | 27,58 | 2,866 | 95,18  |  |
|   |   | 28,80 | 2,993 | 99,40  |  |
|   |   | 29,81 | 3,099 | 102,92 |  |

Результаты таблицы 35 свидетельствуют, что на каждом уровне концентраций получены сопоставимые результаты, стандартное отклонение не превышает 3%.

Из данных, полученных в таблице 35, следует также, что рассчитанная величина критерия Стьюдента  $t$  составляет 0,23, при этом полученная величина меньше теоретического значения критерия Стьюдента ( $0,23 < 2,31$ ) и можно говорить о том, что методика не отягощена систематической ошибкой [17].

Подобранные оптимальные условия анализа позволили предложить методику определения родственных примесей в следующей редакции:

*Испытуемый раствор.* Около 200 мг (точная масса) субстанции *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляют 80 мл воды для хроматографии для полного растворения субстанции. Далее объем раствора доводят водой для хроматографии до метки.

*Раствор сравнения А.* 20,0 мг примеси (хиназолин-4(3*H*)-он) растворяют в воде для хроматографии в мерной колбе вместимостью 100 мл. Аликвоту полученного раствора объемом 1,0 мл переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора до метки водой для хроматографии.

*Допустимое содержание примесей.* На электрофореграмме испытуемого раствора площадь пика примеси должна быть не более площади пика хиназолин-4(3*H*)-она (0,1%).

Разработанную методику использовали для анализа 3 лабораторных серий VMA-13-15. В одном из образцов была обнаружена анализируемая примесь (рисунок 18, время миграции около 4,1 минут), содержание которой не превышало 0,1% [84].

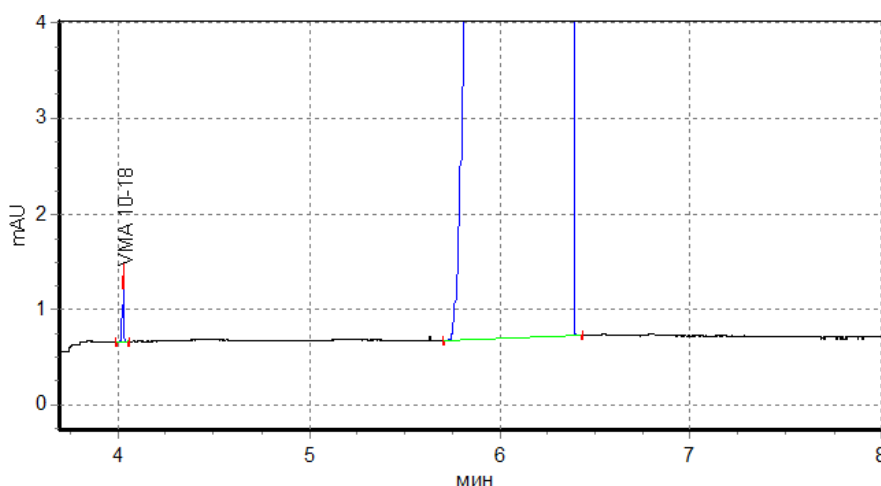


Рисунок 18 – Электрофореграмма лабораторного образца *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина (серия 2017)

### 5.3. Определение *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Кроме метода капиллярного электрофореза для количественного анализа содержания *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина, а также для определения родственных примесей (незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она) в качестве основного метода нами был использован метод ВЭЖХ. Метод широко применяется для контроля качества: идентификации, количественного определения действующих веществ и примесей при анализе фармацевтических субстанций, а также позволяет проводить сочетанное использование с масс-спектрометром, с помощью которого можно определить строение возможных примесей [27].

В связи с тем, что с помощью метода капиллярного электрофореза нами показана возможность присутствия примеси незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она, то выбор условий хроматографического исследования начинали с подбора состава подвижной фазы, оптимальной для обнаружения как исследуемой субстанции, так и возможных примесных соединений. Нами было использованы несколько систем (ацетонитрил: ацетатный буферный раствор / фосфатный буферный раствор; метанол: ацетатный буферный раствор / фосфатный буферный раствор, ацетонитрил / 0,5% муравьиная кислота). В результате было установлено, что

наиболее оптимальной оказалась система ацетонитрил – 0,5% муравьиная кислота. Далее нами были приготовлены растворы, содержащие различное соотношение ацетонитрила и муравьиной кислоты (таблица 36) [67].

Таблица 36 – Соотношение компонентов в подвижной фазе

| № ПФ | Компоненты ПФ  |                           | Время анализа, мин | Скорость потока, мл/мин |
|------|----------------|---------------------------|--------------------|-------------------------|
|      | ацетонитрил, % | 0,5 муравьиная кислота, % |                    |                         |
| 1    | 100            | 0                         | 3,78               | 1                       |
| 2    | 20             | 80                        | 10,05              | 1                       |
| 3    | 50             | 50                        | 5,17               | 1                       |
| 4    | 25             | 75                        | 8,24               | 1                       |

В результате было установлено, что наиболее оптимальной оказалась система ацетонитрил – 0,5% муравьиная кислота в соотношении 20:80, так как полученные пики на хроматограмме симметричны и четко разделены между собой (рисунок 19). Выбранная длина волны детектирования была установлена в ходе спектрофотометрического анализа (раздел 3.3.1.2) [67].

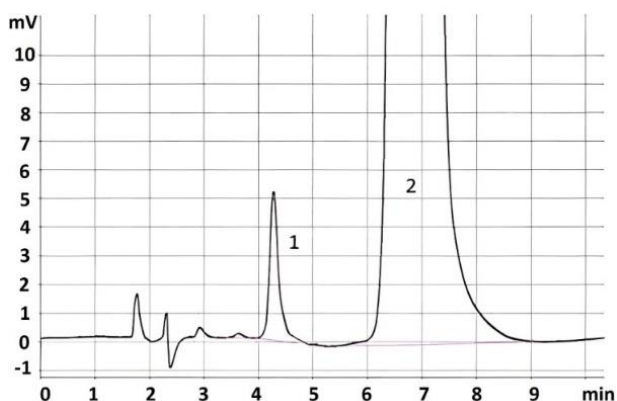


Рисунок 19 – Хроматограмма модельной смеси условного стандартного образца *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина (2) и незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она (1)

Для предварительных исследований растворы стандартного и лабораторного образцов были исследованы при условиях анализа, указанных в главе 2.

Выбранные условия определения оказались пригодными анализа для

*N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина, так как на хроматограмме условного стандартного образца с концентрацией раствора  $C = 0,0252$  мг/мл (рисунок 20) четко виден симметричный пик с временем удерживания 6,575. Хроматограмма лабораторного образца БАС выглядит аналогично (рисунок 21) [67].

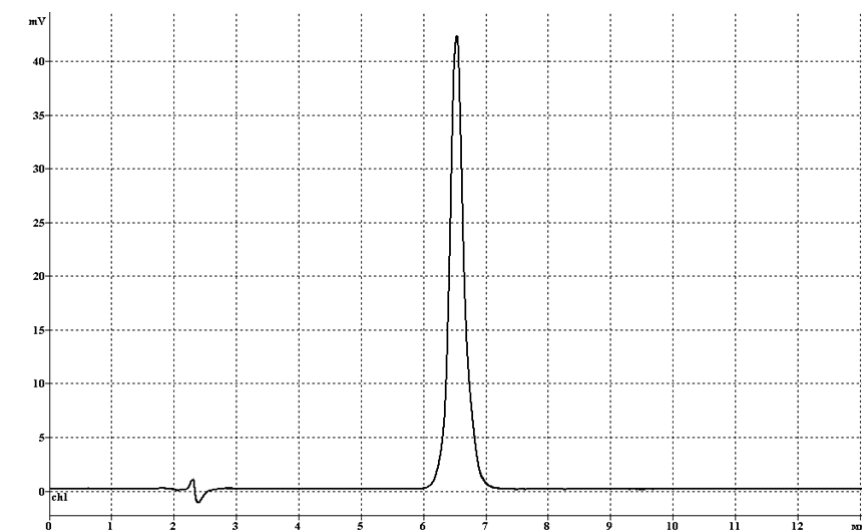


Рисунок 20 – Хроматограмма условного стандартного образца *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

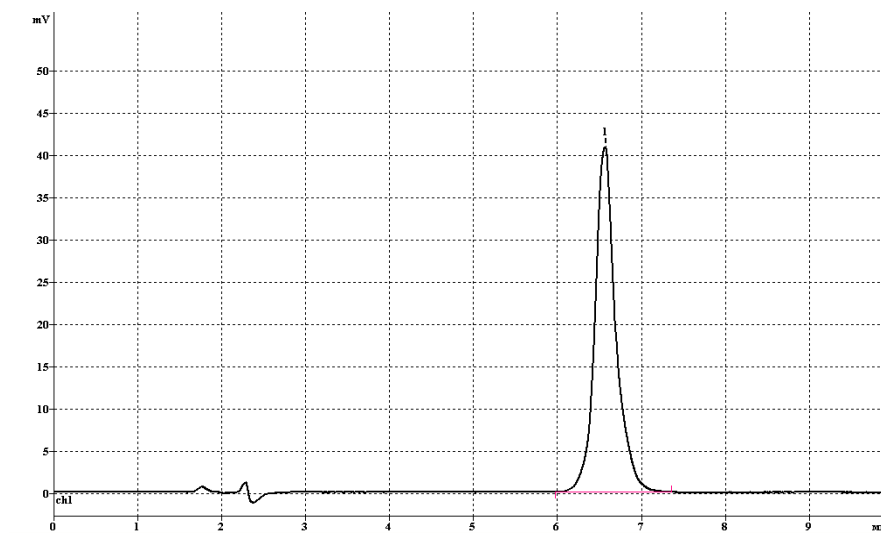


Рисунок 21 – Хроматограмма лабораторного образца *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

Сравнительная оценка характеристик стандартного и испытуемого образцов представлена в таблице 37.

Таблица 37 – Характеристики лабораторного и условного стандартного образцов *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

| Показатель   | Испытуемый образец | УСО    | Отклонения, % |
|--|--------------------|--------|---------------|
| Время, мин   | 6,687              | 6,576  | 1,68          |
| Высота, mV   | 41,4               | 43,2   | 4,16          |
| Начало, мин  | 5,913              | 5,881  | 0,54          |
| Конец, мин   | 7,337              | 7,412  | 1,01          |
| Площадь  | 699,17             | 693,54 | 0,81          |
| Фактор асимметрии ( $A_s$ )                        | 1,29               | 1,30   | 0,76          |
| Эффективность ( $N$ ), число теоретических тарелок | 3332               | 3294   | 1,15          |

Данные, представленные в таблице 37, могут служить основанием для идентификации исследуемого вещества, а также для оценки пригодности выбранной хроматографической системы. Для этого были статистически обработаны и получены значения относительного стандартного отклонения при 6 параллельных определениях УСО *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина по следующим показателям: время удерживания, площадь пика, фактор асимметрии, а также количество теоретических тарелок согласно требованиям ГФ РФ 15 издания ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография» (таблица 38) [18].

Полученные данные (таблица 38) свидетельствуют о том, что число теоретических тарелок больше 1500, фактор асимметрии укладывается в интервал от 0,8 до 1,5, что доказывает пригодность разработанных условий анализа для исследуемого соединения [17]. Относительная ошибка определения времени удерживания, площади пика и эффективности не превышает 3% [67].

Таблица 38 – Хроматографические характеристики пиков *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

| № | Время удерживания ( $t_r$ ), мин | Площадь пика | Фактор асимметрии ( $A_s$ ) | Эффективность ( $N$ ), количество теоретических тарелок |
|---|----------------------------------|--------------|-----------------------------|---|
| 1 | 6,576                            | 694,24       | 1,30                        | 3286  |
| 2 | 6,687                            | 695,17       | 1,29                        | 3332  |
| 3 | 6,563                            | 699,84       | 1,29                        | 3357  |
| 4 | 6,784                            | 697,36       | 1,36                        | 3192  |
| 5 | 6,700                            | 696,21       | 1,32                        | 3245  |
| 6 | 6,795                            | 698,33       | 1,33                        | 3239  |

Продолжение Таблицы 38

|           |       |        |       |       |
|-----------|-------|--------|-------|-------|
| $\bar{x}$ | 6,684 | 696,85 | 1,31  | 3275  |
| DS        | 0,098 | 2,07   | 0,027 | 61,93 |
| RDS       | 1,46% | 0,29%  | 2,06% | 1,89% |

На основании полученных данных (таблица 38) пригодной хроматографическая система будет считаться, если выполняются требования, приведенные в таблице 39.

Таблица 39 – Пригодность хроматографической системы

| Показатель   | Значение                                  |
|--|---|
| Эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику | Число теоретических тарелок не менее 1500 |
| Относительное стандартное отклонение времени удерживания       | Не превышает 5%                           |
| Относительное стандартное отклонение площади пика              | Не превышает 5%                           |

Таким образом, данные, представленные в таблице 39, могут послужить основанием для возможности идентификации исследуемого вещества, а также для включения данных пригодности хроматографической системы в проект нормативной документации. Выбранные условия послужили основанием разработки методики идентификации и количественного определения БАС (глава 2).

### **5.3.1. Валидационная оценка пригодности разработанной методики определения биологически активного соединения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии**

При определении специфичности раствора условного стандартного образца VMA-13-15 было установлено, что, помимо пика исследуемой субстанции, присутствие посторонних пиков не наблюдали, что свидетельствует о специфичности предлагаемой методики.

Для оценки линейности готовили растворы (глава 2) и изучали зависимость значений площадей пиков от концентрации пробы. Калибровочный график и его

характеристики представлены на рисунке 22 и в таблице 40.

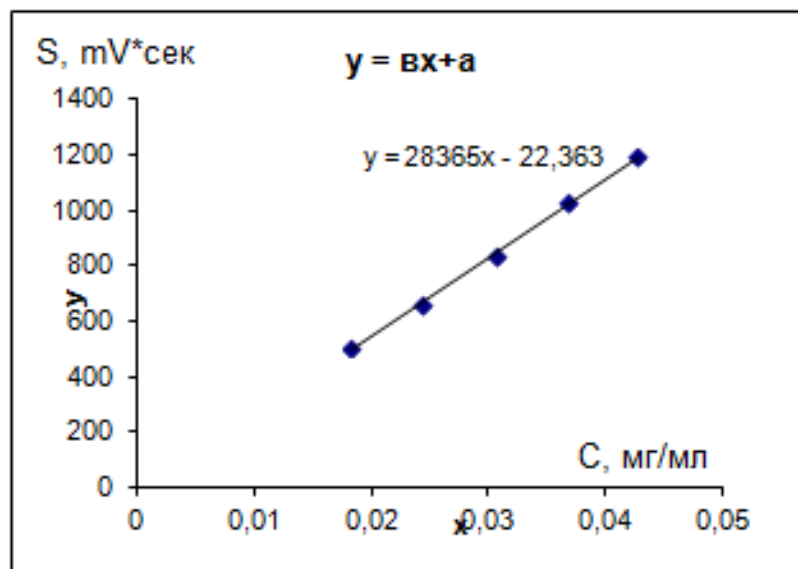


Рисунок 22 – Калибровочный график линейной зависимости площади пиков от концентрации *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

Таблица 40 – Параметры графика линейной зависимости

| Концентрация, мг/мл | Площадь пика | Параметры линейной зависимости |                  |
|---------------------|--------------|--------------------------------|------------------|
| 0,0183              | 507,15       | $b=28366,63$                   | $a=22,423$       |
| 0,0244              | 659,71       | $S_b=561,90$                   | $S_a=17,834$     |
| 0,0306              | 836,12       | $\Delta b=1788,24$             | $\Delta a=56,75$ |
| 0,0367              | 1025,73      | $r=0,9988$                     |                  |
| 0,0427              | 1190,76      |                                |                  |

Полученные значения площади пиков находятся в линейной зависимости от концентрации взятой пробы. Коэффициент корреляции  $r=0,9988$  соответствует требованиям ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» ( $r \geq 0,99$ ) [17]. Таким образом, методика валидна по критерию линейность и может быть рекомендована для количественного определения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина [67].

В соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012 на этапе разработки оригинальной методики достаточно определять повторяемость (сходимость) результатов, получаемых с ее использованием [17]. Для анализа использовали

предлагаемую методику (глава 2) и испытываемый образец с потерей в массе при высушивании 0,5% (таблица 41) [67].

Таблица 41 – Повторяемость (сходимость) результатов количественного определения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина ( $a_0=0,0500$ ;  $S_0=699,43$ )

| Навеска, г | S      | Найдено, % | Метрологические характеристики   |
|------------|--------|------------|--|
| 0,0504     | 702,64 | 101,27     | $\bar{x}=99,78$<br>$S=1,20$<br>$RSD\bar{x}=1,20\%$<br>$S_{\bar{x}}=0,49$<br>$\varepsilon=1,26\%$ |
| 0,0499     | 699,17 | 100,46     |  |
| 0,0498     | 692,90 | 99,56      |  |
| 0,0496     | 681,45 | 97,91      |  |
| 0,0503     | 697,10 | 100,47     |  |
| 0,0498     | 689,36 | 99,05      |  |

Установлено, что относительное стандартное отклонение составляет 1,2%, что свидетельствует о достаточно высокой сходимости результатов количественного определения [86].

При тестировании методики по критерию «правильность» применяли значение свободного члена, полученного из уравнения регрессии. Известно, если свободный член уравнения (таблица 41) статистически достоверно не отличается от нуля, то при использовании такой методики результаты не имеют систематической ошибки. Из полученных результатов статистической обработки уравнения коэффициент «*b*» имеет доверительный интервал ( $28365x \pm 1788,24$ ), а свободный член «*a*» значимо не отличается от нуля, потому что его доверительный интервал равен 56,75 ( $22,423 \pm 56,75$ ) и значительно превышает значение коэффициента. Из-за того, что свободный член «*a*» = 0, уравнение принимает вид  $y=28365x$ , и предлагаемая нами методика не отягощена систематической погрешностью [17].

Данная методика апробирована на 3 лабораторных образцах субстанции *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина (таблица 42) [67].

Таблица 42 – Результаты определения количественного содержания *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

| Серия | Навеска, г | S      | Найдено, % | Метрологические характеристики   |
|-------|------------|--------|------------|--|
| 2017  | 0,0505     | 701,32 | 100,93     | $\bar{x}=100,08$<br>$S=0,80$<br>$RSD\bar{x}=0,80\%$<br>$S_{\bar{x}}=0,33$<br>$\varepsilon=0,84\%$  |
|       | 0,0498     | 698,12 | 99,84      |  |
|       | 0,0497     | 694,65 | 99,21      |  |
|       | 0,0499     | 691,84 | 100,36     |  |
|       | 0,0502     | 700,55 | 100,99     |  |
|       | 0,0496     | 696,28 | 99,17      |  |
| 2019  | 0,0502     | 695,15 | 100,28     | $\bar{x}=100,08$<br>$S=1,01$<br>$RSD\bar{x}=1,02\%$<br>$S_{\bar{x}}=0,415$<br>$\varepsilon=1,07\%$ |
|       | 0,0496     | 699,86 | 99,75      |  |
|       | 0,0501     | 703,14 | 101,16     |  |
|       | 0,0497     | 692,32 | 98,81      |  |
|       | 0,0503     | 701,21 | 101,29     |  |
|       | 0,0495     | 697,78 | 99,19      |  |
| 2021  | 0,0500     | 693,96 | 99,64      | $\bar{x}=100,01$<br>$S=0,66$<br>$RSD\bar{x}=0,67\%$<br>$S_{\bar{x}}=0,27$<br>$\varepsilon=0,7\%$   |
|       | 0,0499     | 697,22 | 99,91      |  |
|       | 0,0502     | 699,94 | 100,97     |  |
|       | 0,0495     | 696,36 | 99,06      |  |
|       | 0,0501     | 698,11 | 100,51     |  |
|       | 0,0497     | 699,48 | 99,92      |  |

Таким образом, на первом этапе выбраны условия и разработана методика количественного определения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом ВЭЖХ [67].

Цель второго этапа – разработка методики определения родственных примесей с использованием выбранных условий ВЭЖХ-анализа (раздел 5.1).

#### **5.4. Определение родственных примесей *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии**

В связи с тем, что предварительными исследованиями показано, что исследуемое БАС и его возможная примесь четко разделяются между собой (рисунок 20), нами были разработаны методики идентификации и количественного определения предполагаемой примеси незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она в субстанции VMA-13-15.

Для проведения анализа был использован УСО субстанции VMA-13-15 и

примеси незамещенного хиназолин-4(3H)-она. Для этого были приготовлены растворы исследуемых соединений (глава 2). Время выхода пика примеси незамещенного хиназолин-4(3H)-она (рисунок 23) – 4,2 минуты [84].

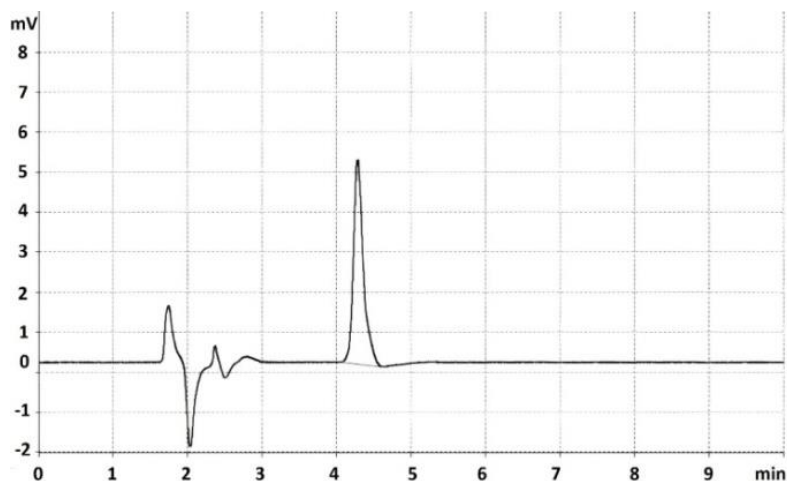


Рисунок 23 – Хроматограмма раствора примеси незамещенного хиназолин-4(3H)-она

Пригодность выбранных условий устанавливали с учетом требований ОФС.1.2.1.2.000.15 [17]. Установлены следующие параметры, представленные в таблице 43 [84].

Таблица 43 – Параметры пригодности хроматографической системы

| Вещество           | Время удерживания, $t_R$ , мин | Разрешение, $R_s$ | Фактор асимметрии, $A_s$ | Число теоретических тарелок, $N$ |
|--------------------|--------------------------------|-------------------|--------------------------|----------------------------------|
| Хиназолин-4(3H)-он | 4,277                          | 8,25              | 1,60                     | 3096                             |
| VMA-13-15          | 6,795                          |                   | 1,33                     | 3295                             |

Полученные данные таблицы 43 свидетельствуют о пригодности используемой хроматографической системы, так как разрешение ( $R_s$ ) пика примеси незамещенного хиназолин-4(3H)-она и УСО *N*-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина составило 8,25, что говорит о хорошем разделении (рекомендуемое значение  $R_s$  при определении содержания примесей  $\geq 2$ ). Число теоретических тарелок также укладывается в требуемый показатель  $\geq 1500$  [17].

На основании полученных данных была разработана и валидирована методика определения родственной примеси с использованием модельных растворов (глава 2).

Специфичность методики подтверждается, так как время удерживания пиков в модельной смеси (рисунок 20) полностью совпадает с временем удерживания при хроматографировании исследуемых веществ (рисунок 24).

При определении линейности готовили 5 уровней концентраций (0,05; 0,1; 0,15; 0,2 и 0,25%) незамещенного хиназолин-4(3H)-она в *N*-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина. По результатам, полученным при анализе данных растворов, строили прямые зависимости площадей пика от концентрации примеси в растворе (рисунок 24) [84].

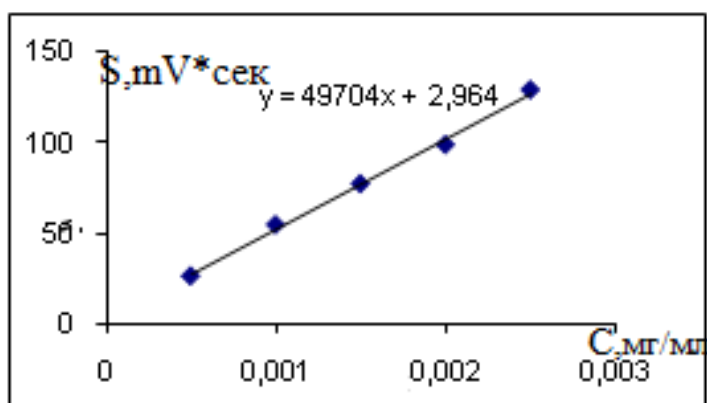


Рисунок 24 – Калибровочный график линейной зависимости площади пиков от концентрации хиназолин-4(3H)-она

В таблице 44 приведены результаты рассчитанных параметров линейной зависимости.

Таблица 44 – Результаты определения линейной зависимости площадей пика от концентрации хиназолин-4(3H)-она

| Концентрация примеси, мг/мл | Площадь пика | Параметры линейной зависимости |                 |
|-----------------------------|--------------|--------------------------------|-----------------|
| 0,0005                      | 26,88        | $b=49704$                      | $a=2,964$       |
| 0,0010                      | 55,02        | $S_b=1699,54$                  | $S_a=2,81$      |
| 0,0015                      | 77,56        | $\Delta b=5408,70$             | $\Delta a=8,96$ |
| 0,0020                      | 98,98        | $r=0,9965$                     |                 |
| 0,0025                      | 129,16       |                                |                 |

Данные, представленные в таблице 44, свидетельствуют, что методика валидна по показателю «линейность», так как коэффициент корреляции составил  $r=0,9965$ . Затем по данным линейной зависимости нами были рассчитаны предел обнаружения (ПО) и предел количественного определения (ПКО): ПО=0,18 мкг/мл; ПКО=0,57 мкг/мл. Полученные значения свидетельствуют о том, что при определении примеси в количестве 0,1% получатся достоверные результаты [84].

При проверке методики по показателю «правильность» использовали значение свободного члена, полученного из уравнения регрессии (таблица 44). Известно, если свободный член в уравнении статистически достоверно не отличается от нуля, то при использовании такой методики результаты не имеют систематической ошибки. Из полученных результатов статистической обработки уравнения коэффициент « $b$ » имеет доверительный интервал 5408,70 ( $49704 \pm 5408,70$ ), а свободный член « $a$ » значимо не отличается от нуля, потому что его доверительный интервал равен 8,96 ( $2,964 \pm 8,96$ ) и значительно превышает значение коэффициента. Из-за того, что свободный член « $a$ » = 0, уравнение принимает вид  $y=49704x$  и предлагаемая нами методика не отягощена систематической погрешностью.

Критерий повторяемости (сходимости) определяли путем хроматографирования 6 определений раствора с концентрацией 0,1% содержания примеси от содержания *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина. Результаты хроматографического анализа представлены в таблице 45 [84].

Таблица 45 – Результаты определения сходимости методики определения примеси незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она ( $C_{ст}$ -0,001 мг/мл;  $S_{ст}$ -55,02 мВ)

| Навеска, г | Площадь пика | Найдено, мг/мл | Найдено, % | Метрологические характеристики  |
|------------|--------------|----------------|------------|---|
| 0,2005     | 59,54        | 0,00108        | 0,1082     | $\bar{x}=0,1018$<br>$S=0,0037$<br>$RSD\bar{x}=3,63\%$<br>$S_{\bar{x}}=0,0015$<br>$\varepsilon=3,83\%$ |
| 0,1998     | 57,27        | 0,00104        | 0,1040     |   |
| 0,2003     | 54,61        | 0,00099        | 0,0992     |   |
| 0,1999     | 53,98        | 0,00098        | 0,0981     |   |
| 0,2007     | 55,75        | 0,00101        | 0,1013     |   |
| 0,1996     | 55,03        | 0,00100        | 0,1001     |   |

Как следует из данных таблицы 45, методика определения родственной

примеси валидна по показателю «прецизионность» (сходимость), так как при анализе субстанций с содержанием примесей 0,1% величина RSD не должна превышать 5% [86].

На последнем этапе наших исследований нами был проведен анализ 3 серий лабораторных образцов VMA-13-15. Найденное количество примеси в образце (2017 г.) не превышало нормируемых требований (не более 0,1% для каждой примеси) [84].

### **5.5. Определение остаточных органических растворителей в субстанции N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом газовой хроматографии**

Изучение схемы синтеза исследуемого БАС показало использование при его получении и перекристаллизации таких органических растворителей как метанол и диэтиловый эфир [70]. Хотя БАС подвергается тщательной очистке, на конечной стадии в нем могут обнаруживаться минимальные количества указанных растворителей. Поэтому актуальной является разработка методики идентификации и количественного определения возможных примесей остаточных органических растворителей [43].

Согласно требованиям ОФС.1.1.0008 Остаточные органические растворители распределены на 3 класса по предельно допустимому содержанию в лекарственных средствах и степени их возможного влияния на здоровье человека. Метанол относится ко второму классу токсичности с предельным содержанием 3000 ppm. Диэтиловый эфир относится к 3 классу токсичности. Содержание обеих примесей не должно превышать 0,5% [17].

Определение остаточных органических растворителей проводили методом газовой хроматографии на приборе – «Кристалл-2000М» (зав. номер 6596), используя следующие условия хроматографирования:

Колонка насадочная – ZB-FFAP, 50м 0,32 мм·0,5 мм

Газ-носитель – азот ОСЧ 99,996%

Скорость потока – 10 мл/мин

Объем вводимой пробы – 1 мкл

Температура колонки – 160°C

Температура испарителя – 180°C

Температура детектора – 220°C

Давление газа – 65 кПа

Длина колонки – 50 м

Диаметр колонки – 0,32 мм

Для количественного определения остаточного содержания метанола и диэтилового эфира логично в качестве растворителя использовать воду очищенную, так как растворимость БАС в воде составляет 1:30 [51], диэтиловый эфир мало растворим в воде, а метанол смешивается с водой во всех соотношениях.

Для подтверждения возможности определения метанола и диэтилового эфира при совместном присутствии предварительно определяли влияние растворителя на хроматографическую подвижность диэтилового эфира и метанола. С этой целью вводили в хроматографическую колонку пробы водного раствора модельной смеси (рисунок 25), содержащего по 50 мг/мл стандартных образцов диэтилового эфира (ОСТ-84-2006-88) и метанола (ГСО 8461-2003) [43].

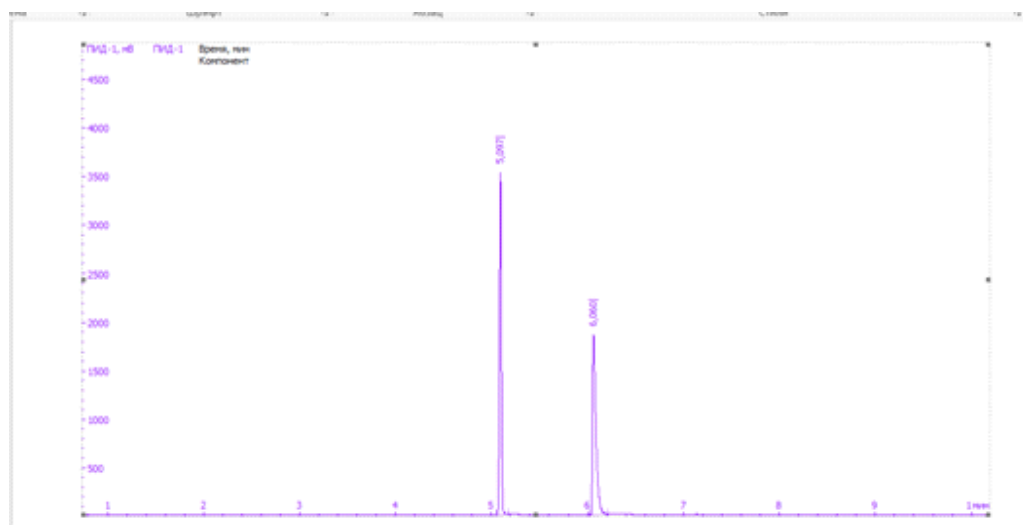


Рисунок 25 – Хроматограмма модельной смеси диэтилового эфира и метанола в воде очищенной

На хроматограмме (рисунок 25) наблюдали полное разделение пиков метанола и диэтилового эфира (время удерживания метанола – 6,060 минут, пика диэтилового эфира – 5,097 минут), что подтверждает возможность определения указанных соединений при совместном присутствии в анализируемом образце.

С этой целью нами предложена методика, описанная в главе 2. В качестве стандартных образцов были взяты образцы диэтилового эфира (ОСТ-84-2006-88) и метанола (ГСО 8461-2003) [43].

### **5.5.1. Валидационная оценка пригодности разработанной методики определения остаточных количеств органических растворителей методом газовой хроматографии**

Для валидации предлагаемой методики нами были приготовлены модельные смеси.

Для подтверждения специфичности методики определяли влияние растворителя на разделение пиков диэтилового эфира и метанола (рисунок 26). С этой целью вводим в хроматографическую колонку пробы водного раствора модельной смеси, содержащий по 50 мг/мл стандартных образцов диэтилового эфира (ОСТ-84-2006-88) и метанола (ГСО 8461-2003).

Для определения линейности методики готовили в воде очищенной растворы стандартных образцов метанола и диэтилового эфира х.ч. с концентрацией каждого 10,0 мг/мл (1 мл каждого растворителя в колбу вместимостью 100 мл – исходный раствор). Для этого по 1 мл СО каждого растворителя помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили водой очищенной до метки. Далее из полученных растворов методом разведения водой очищенной готовили следующие растворы с концентрацией от 0,10 мг/мл до 0,35 мг/мл для раствора метанола и с концентрацией от 0,10 мг/мл до 0,6 мг/мл для диэтилового эфира. С этой целью из исходных растворов отбирали 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 мл раствора метанола и 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 мл диэтилового

эфира соответственно, помещали в мерные колбы вместимостью 100 мл и доводили водой очищенной до метки.

В хроматографическую колонку вводили по 1 мкл каждого раствора из приготовленной серии разведений. Анализ каждого раствора проводили не менее трех раз. На основании полученных данных строили калибровочные графики зависимости площади пика от концентрации раствора [43].

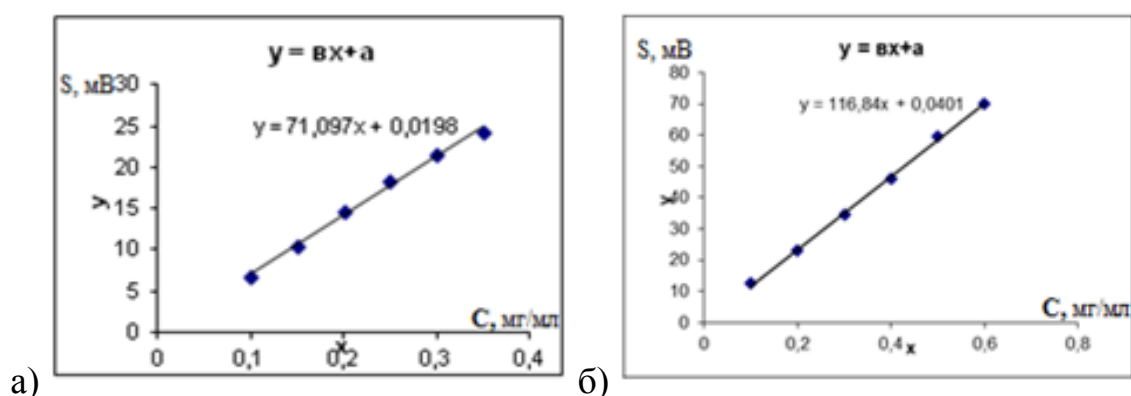


Рисунок 26 – Калибровочный график зависимости площади пика от концентрации метанола (а) и диэтилового эфира (б)

Таблица 46 – Результаты определения зависимости площади пиков от концентрации метанола

| Концентрация метанола, мг/мл | Количества примеси, ppm | Площадь пика | Параметры линейной зависимости |                  |
|------------------------------|-------------------------|--------------|--------------------------------|------------------|
| 0,10                         | 2000                    | 6,838        | $a=0,0198$                     | $b=71,097$       |
| 0,15                         | 3000                    | 10,408       | $S_a=0,4314$                   | $S_b=2,033$      |
| 0,20                         | 4000                    | 14,615       | $\Delta a=1,197$               | $\Delta b=5,646$ |
| 0,25                         | 5000                    | 18,421       | $r=0,9987$                     |                  |
| 0,30                         | 6000                    | 21,531       |                                |                  |
| 0,35                         | 7000                    | 24,287       |                                |                  |

Таблица 47 – Результаты определения зависимости площади пиков от концентрации диэтилового эфира

| Концентрация диэтилового эфира, мг/мл | Количества примеси, ppm | Площадь пика | Параметры линейной зависимости |                  |
|---------------------------------------|-------------------------|--------------|--------------------------------|------------------|
| 0,1                                   | 2000                    | 12,526       | $b=114,55$                     | $a=0,5068$       |
| 0,2                                   | 4000                    | 22,951       | $S_b=2,109$                    | $S_a=0,699$      |
| 0,3                                   | 6000                    | 34,484       | $\Delta a=1,943$               | $\Delta b=5,857$ |
| 0,4                                   | 8000                    | 46,041       | $r=0,9989$                     |                  |
| 0,5                                   | 10000                   | 58,566       |                                |                  |
| 0,6                                   | 12000                   | 69,032       |                                |                  |

Таким образом, установлена линейная зависимость площади пика от концентрации метанола и диэтилового эфира (рисунок 26, таблицы 46 и 47).

Линейную зависимость результатов ( $r \geq 0,99$ ) подтверждают рассчитанные значения коэффициентов корреляции ( $r$ ) градуировочных графиков: для метанола – 0,9987, для диэтилового эфира – 0,9989.

Предел обнаружения (ПО) и предел количественного определения (ПКО) рассчитывали, используя параметры линейной зависимости. Для метанола и диэтилового эфира полученные данные составили  $ПО=0,0943$  мг/мл и  $0,0201$  мг/мл,  $ПКО=0,285$  мг/мл и  $0,0610$  мг/мл соответственно.

Таким образом, при рабочей концентрации раствора VMA-13-15 5%, возможно обнаружение примеси метанола и диэтилового эфира в концентрации от  $0,285$  мг/мл и  $0,0610$  мг/мл соответственно [43].

Правильность методики оценивали с помощью параметров линейной зависимости, в частности по значению свободного члена уравнения. Приведенные результаты (таблицы 46 и 47) показывают, что для метанола доверительный интервал свободного члена уравнения ( $a$ ) равен  $1,197$ , а для диэтилового эфира –  $1,943$ , что превышает значение свободного члена уравнения ( $a$ ) и это свидетельствует об отсутствии систематической погрешности методики. Таким образом, методика валидирована по показателям «правильность» и «линейность».

Для определения прецизионности методики использовали модельные смеси БАС с добавлением СО диэтилового эфира и метанола на трех уровнях по девяти точкам. Для этого брали по  $0,5000$  г (точная навеска) УСО VMA-13-15 помещали в 9 мерных колб вместимостью  $10$  мл, добавляли  $2$  мл воды для хроматографирования, и  $1,0$  мл,  $2,0$  мл или  $3,0$  мл соответственно раствора А метанола или  $2,0$  мл,  $3$  мл или  $4$  мл раствора А диэтилового эфира, доводили до метки водой и перемешивали до полного растворения. Результаты определения прецизионности представлены в таблицах 48 и 49 [43].

Таблица 48 – Определение прецизионности методики в модельных смесях с метанолом ( $S_{ст} = 13,925$ ;  $C_{ст} = 0,2000$ )

| Уровень | Взято метанола, мг/мл | Площадь пика | Найдено метанола, мг/мл | Найдено метанола, % | Метрологические характеристики  |
|---------|-----------------------|--------------|-------------------------|---------------------|---|
| 1       | 0,1000                | 6,851        | 0,0984                  | 98,40               | $\bar{x}=101,84$<br>$S=3,23$<br>$S_x=1,07$<br>$RSD\bar{x}=1,05\%$<br>$\varepsilon=2,49\%$ |
|         |                       | 6,799        | 0,0976                  | 97,60               |   |
|         |                       | 6,864        | 0,0986                  | 98,60               |   |
| 2       | 0,2000                | 14,362       | 0,2062                  | 103,1               |   |
|         |                       | 14,620       | 0,2099                  | 104,95              |   |
|         |                       | 14,592       | 0,2095                  | 104,75              |   |
| 3       | 0,3000                | 21,930       | 0,3149                  | 104,96              |   |
|         |                       | 21,880       | 0,3142                  | 104,73              |   |
|         |                       | 20,784       | 0,2985                  | 99,50               |   |

Таблица 49 – Определение прецизионности методики в модельных смесях с диэтиловым эфиром (ДЭ) ( $S_{ст} = 34,840$   $C_{ст} = 0,3000$ )

| Уровень | Взято ДЭ, мг/мл | Площадь пика | Найдено ДЭ, мг/мл | Найдено ДЭ, % | Метрологические характеристики   |
|---------|-----------------|--------------|-------------------|---------------|--|
| 1       | 0,2000          | 22,922       | 0,1974            | 98,70         | $\bar{x}=99,37$<br>$S=0,84$<br>$S_x=0,27$<br>$RSD\bar{x}=0,27\%$<br>$\varepsilon=0,66\%$ |
|         |                 | 22,978       | 0,1978            | 98,90         |  |
|         |                 | 22,953       | 0,1976            | 98,80         |  |
| 2       | 0,3000          | 34,583       | 0,2977            | 99,23         |  |
|         |                 | 34,520       | 0,2972            | 99,06         |  |
|         |                 | 34,349       | 0,2957            | 98,56         |  |
| 3       | 0,4000          | 46,526       | 0,4006            | 100,15        |  |
|         |                 | 46,402       | 0,3995            | 99,87         |  |
|         |                 | 46,923       | 0,4040            | 101,10        |  |

Как следует из данных таблиц 48 и 49, данная методика валидна по параметру прецизионности, так как относительная погрешность (RSD) не превышает 3% при определении каждого из растворителей.

Разработанная методика обнаружения остаточных растворителей была апробирована на VMA-13-15 (серия 2019). На хроматограммах анализируемых образцов (рисунки 27 и 28) выявлены пики, соответствующие по времени удерживания пикам метанола и диэтилового эфира СО.

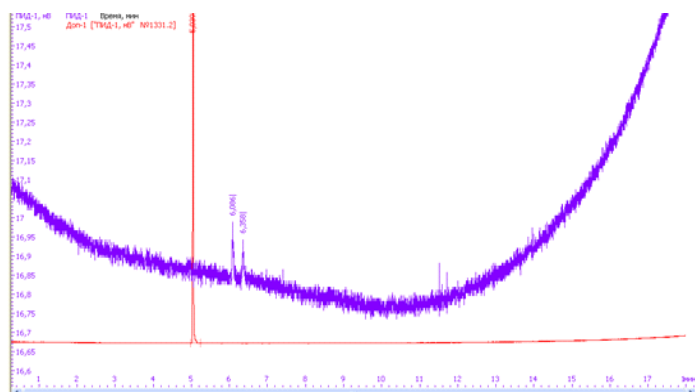


Рисунок 27 – Хроматограммы раствора 0,1% раствора диэтилового эфира и *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

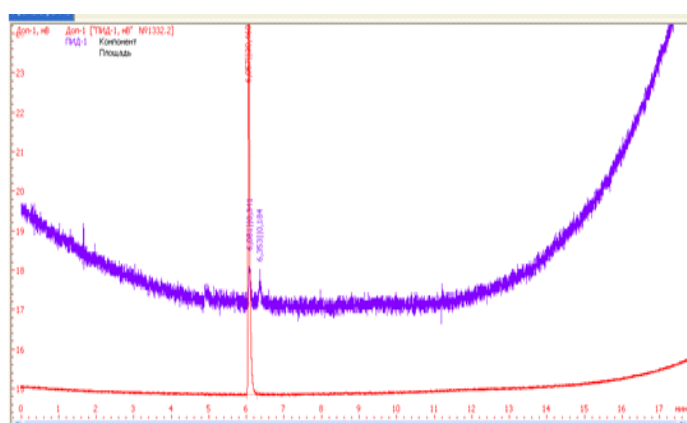


Рисунок 28 – Хроматограммы раствора 0,1% раствора метанола и *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

Наложение хроматограмм лабораторного образца VMA-13-15 и модельных смесей искомых остаточных растворителей показало, что пики СО метанола и диэтилового эфира полностью совпадают по времени удерживания с аналогичными пиками лабораторного образца БАС. В случае лабораторного образца БАС это подтверждает присутствие в нем метанола и диэтилового эфира в следовых количествах [43].

Рассчитанные значения содержания метанола и диэтилового эфира, оказались ниже значений ПКО (0,285 мг/мл и 0,0610 мг/мл), что подтверждает наличие лишь следовых количеств остаточных растворителей [43].

Результаты количественного определения следовых количеств метанола и диэтилового эфира статистически обработаны по времени удерживания. Полученные данные представлены в таблице 50.

Таблица 50 – Результаты статистической обработки времени удерживания метанола и диэтилового эфира при их определении в *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидине

| Метанол |                                | Диэтиловый эфир |                                |
|---------|--------------------------------|-----------------|--------------------------------|
| $t_R$   | Метрологические характеристики | $t_R$           | Метрологические характеристики |
| 6,057   | $\bar{x}=6,074$                | 5,035           | $\bar{x}=5,061$                |
| 6,100   | $S=0,015$                      | 5,039           | $S=0,022$                      |
| 6,047   | $S_x=0,005$                    | 5,035           | $S_x=0,007$                    |
| 6,079   | $RSD\bar{x}=0,12$              | 5,093           | $RSD\bar{x}=0,17$              |
| 6,077   | $\varepsilon=0,20\%$           | 5,078           | $\varepsilon=0,33\%$           |
| 6,086   |                                | 5,087           |                                |

Из таблицы 50 следует, что относительная погрешность определения находится в пределах 0,2% для метанола и 0,33% для диэтилового эфира. Эти значения подтверждают возможность обнаруживать следы обоих искомым остаточных растворителей с достаточной точностью и могут служить критерием для подтверждения чистоты БАС [43].

### Заключение по главе 5

1. На основании физико-химических свойств субстанции и анализа литературных данных были выбраны условия для качественного и количественного определения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом капиллярного электрофореза. Выбранные условия оказались пригодными, что позволяет рекомендовать данную методику для идентификации исследуемой субстанции. С учетом подобранных оптимальных условий была разработана методика количественного определения. Проверка основных валидационных характеристик свидетельствовала, что с помощью методики получены достоверные результаты, что позволяет рекомендовать метод капиллярного электрофореза в качестве альтернативного для количественного определения БАС.

2. Подобранные условия анализа также оказались пригодными для разработки методик идентификации и нормирования количественного

содержания родственных примесей (незамещенного хиназолин-4(3*H*)-он) методом капиллярного электрофореза. Валидационная оценка, проведенная с использованием модельных растворов, подтверждает пригодность разработанной методики. Установлен предел содержание примеси не более 0,1%.

3. Обоснован выбор оптимальных условий хроматографического исследования с помощью метода ВЭЖХ как для обнаружения исследуемой субстанции, так и возможных примесных соединений. Подтверждена хроматографическая пригодность выбранных условий. Разработана методика количественного определения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина. Методика валидирована по основным валидационным параметрам. Установлен интервал количественного содержания исследуемой субстанции 99,00-101,0%.

4. На основании выбранных условий были разработаны методики идентификации и количественного определения предполагаемой примеси незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она в субстанции VMA-13-15. Доказано, что выбранные условия пригодны для ее хроматографического анализа. Разработана и валидирована методика определения родственных примесей с использованием метода ВЭЖХ. Нормировано содержание примеси не более 0,1%.

5. Выбраны оптимальные условия определения возможных примесей остаточных органических растворителей (диэтилового эфира и метанола) методом газовой хроматографии. Разработаны методики идентификации и количественного определения с использованием стандартных растворов искомым растворителей. Методика валидирована по основным валидационным характеристикам. Доказано, что методика позволяет обнаруживать искомые остаточные растворители с достаточной точностью.

## ГЛАВА 6. ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ И УСТАНОВЛЕНИЕ СРОКА ГОДНОСТИ *N*-[2-[4-ОКСО-3(4*H*)-ХИНАЗОЛИНИЛ]ПРОПИОНИЛ]- ГУАНИДИНА

### 6.1. Прогнозирование процессов деградации и расчет термодинамических характеристик *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

В процессе многолетнего наблюдения было показано, что с несоблюдением правил хранения многие лекарственные препараты подвергаются деструкции. Промежуточные продукты синтеза также могут присутствовать в качестве посторонних примесей [17,18,31]. Анализ продуктов деградации и примесей являются актуальной задачей в фармацевтическом анализе, потому что снижение качества лекарственного препарата влечет за собой опасность для жизни и здоровья человека.

Как было указано в главе 5, при разработке нормативной документации на новое биологически активное соединение нормирование содержания примесей является обязательным критерием [62].

Изучение молекулы исследуемого БАС и использование компьютерных технологий позволили предположить возможные процессы деградации в водных растворах (схемы реакций 3-7).

Предположительно соединение VMA-13-15 устойчиво в кислой среде. При невысоких значениях температур оно образует дизамещенную соль. В схеме 3 приведена реакция образования соли дигидрохлорида на примере взаимодействия VMA-13-15 с хлористоводородной кислотой. Так как хлористоводородная кислота является сильной, то, согласно теории электролитической диссоциации Аррениуса-Оствальда, она существует в водной среде в виде аниона хлора и гидроксония, который и участвует в протонировании соединения VMA-13-15 (схема 3) [30].

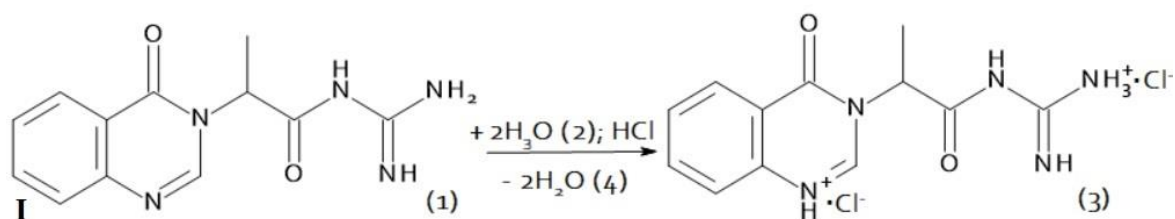


Схема 3 – Образование дизаминозамещенной соли соединения VMA-13-15 в слабокислой среде

При длительном воздействии кислой среды и повышении температуры происходит реакция гидролиза, при этом хлористоводородная кислота участвует в протонировании продуктов гидролиза с образованием солей (схема 4) [30].

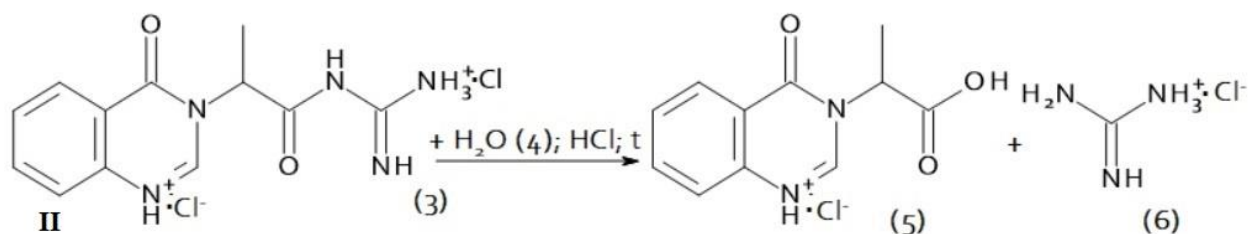


Схема 4 – Гидролиз соединения VMA-13-15 в сильнокислой среде

В слабощелочной среде (реакция V) прогнозируется, что соединение также подвергается гидролизу с образованием соли. Кроме того, известно, что производные гуанидина могут в щелочной среде конденсироваться до производного бигуанида (реакция VI) (схема 5) [30].

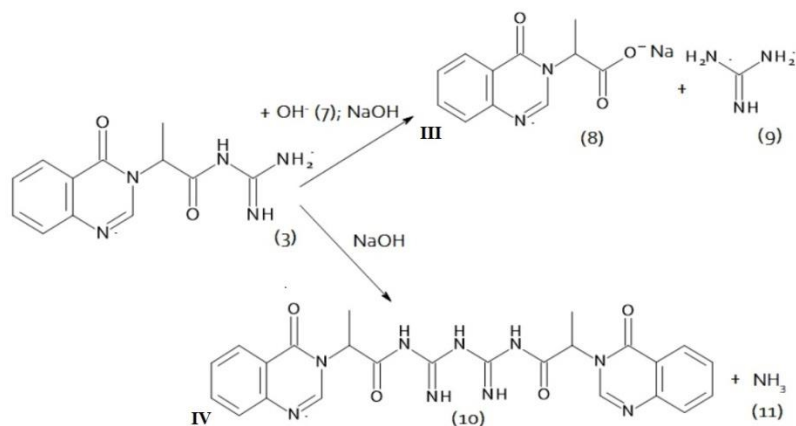


Схема 5 – Гидролиз соединения VMA-13-15 в слабо- и сильнощелочной среде

Примеры предполагаемого радикального окисления приведены в схемах 6 и 7.

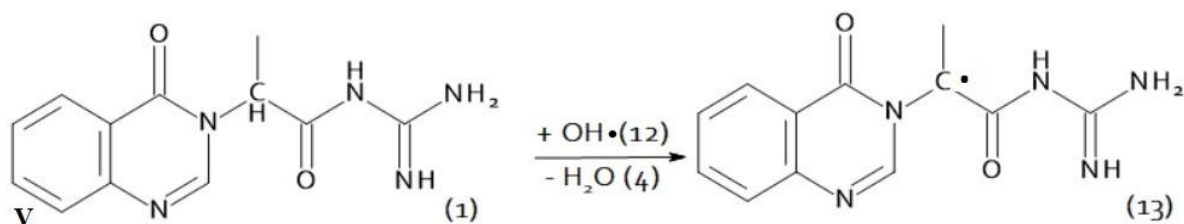


Схема 6 – Радикальное окисление соединения VMA-13-15

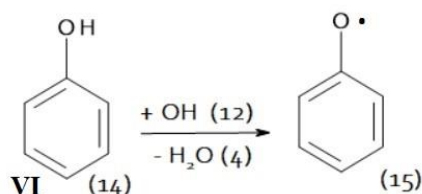


Схема 7 – Радикальное окисление фенола

Оптимизация геометрии рассматриваемых структур проводилась с использованием метода молекулярной механики ММ+ в программе HyperChem 8.0.9 [117]. Далее расчеты проводились с использованием неограниченного метода Хартри-Фока в базисе 3-21G\*, а для завершающей пространственной оптимизации геометрии молекул был использован метод теории функционала плотности *ub3lyp* [101] с базисными наборами 6-311G\*\* [55]. Результирующий колебательный анализ изучаемых термодинамических характеристик проводился в программе Orca [30].

Моделирование термодинамических характеристик позволили получить значения энтальпий (H) и энтропий (S) для изучаемых соединений. Далее по этим данным для каждой рассматриваемой реакции согласно следствию закона Гесса был произведен расчет значения энтальпии реакции ( $\Delta H$ ) по формуле  $\Delta H = \sum \Delta H_{\text{(продуктов реакции)}} - \sum \Delta H_{\text{(исходных веществ)}}$ . Также было рассчитано значение энтропии реакции ( $\Delta S$ ) по формуле  $\Delta S = \sum \Delta S_{\text{(продуктов реакции)}} - \sum \Delta S_{\text{(исходных веществ)}}$  [30].

Вычисления энергии Гиббса реакции ( $\Delta G$ ) производилось по формуле  $\Delta G = \Delta H - \Delta S \times T$ , где значение температуры (T) принимали за 273 градуса Кельвина [9].

Константу равновесия реакции (K) рассчитывали по формуле  $K = \exp \frac{-\Delta G}{RT}$ , где  $\Delta G$  – энергия Гиббса реакции; T – температура при 273 градусах Кельвина; R – универсальная газовая постоянная, равная  $8,31 \times 10^{-3}$  кДж/(моль×К).

В таблице 51 приведены значения энтальпии и энтропии для изучаемых соединений.

Таблица 51 – Значения энтальпии и энтропии моделируемых соединений деструкции N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

| Номер соединения | H, энтальпия, а.е. | H, энтальпия кДж/моль | S, энтропия кал/моль×К | S энтропия кДж /моль×*К |
|------------------|--------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| 1                | -889,3295          | -2334934,2800         | 131,1560               | 0,5488                  |
| 2                | -76,6915           | -201353,5055          | 48,1500                | 0,2015                  |
| 3                | -889,9241          | -2336495,4020         | 133,3480               | 0,5579                  |
| 4                | -76,4224           | -200646,9835          | 46,4750                | 0,1945                  |
| 5                | -760,7520          | -1997354,1010         | 118,7690               | 0,4969                  |
| 6                | -205,6713          | -539989,9237          | 70,9620                | 0,2969                  |
| 7                | -75,7522           | -198887,3737          | 67,4640                | 0,2823                  |
| 8                | -759,8661          | -1995028,1700         | 110,4750               | 0,4622                  |
| 9                | -205,3508          | -539148,4511          | 23,8550                | 0,0998                  |
| 10               | -1722,1118         | -4521403,9070         | 211,0550               | 0,8831                  |
| 11               | -56,5379           | -148440,2360          | 48,1550                | 0,2015                  |
| 12               | -75,7429           | -198862,9565          | 42,5980                | 0,1782                  |
| 13               | -888,6766          | -2333220,0920         | 124,5330               | 0,5210                  |
| 14               | -307,4411          | -807186,4968          | 74,6350                | 0,3123                  |
| 15               | -306,8075          | -805522,9802          | 74,8750                | 0,3133                  |

Затем были рассчитаны значения энтальпии и энтропии для рассматриваемых вариантов деградации соединения VMA-13-15, используя данные таблицы 52. Результаты, приведенные в таблице 52, свидетельствуют, что все реакции, кроме IV, являются экзотермическими [30].

Таблица 52 – Значения энтальпии и энтропии моделируемых реакций деградации N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

| Номер реакции | Энтальпия $\Delta H$ , кДж/моль | Энтропия $\Delta S$ , кДж/моль×К |
|---------------|---------------------------------|----------------------------------|
| I             | -148,0780                       | -0,0049                          |
| II            | -201,6390                       | 0,0414                           |
| III           | -354,9670                       | -0,2691                          |
| IV            | 24,4170                         | -0,0130                          |
| V             | -69,8390                        | -0,0115                          |
| VI            | -120,5100                       | 0,01730                          |

С целью выяснения возможности протекания изучаемых реакций была рассчитана энергия Гиббса ( $\Delta G$ ) с использованием вышеприведенных значений энтальпии и энтропии для реакций при нормальных условиях. В случае, если энергия Гиббса реакции меньше нуля, можно говорить о возможности протекания химического взаимодействия между участниками химического процесса. Из данных, приведенных в таблице 53, следует, что экспериментально осуществима деградация соединения VMA-13-15 по всем предполагаемым реакциям, кроме IV. Реакция разложения VMA-13-15 в щелочной среде с конденсацией двух молекул VMA-13-15 до производного бигуанида в предложенном стехиометрическом виде невозможна. Наиболее легко протекаемой реакцией является III –  $\Delta G = -354.9670$  кДж/моль. В результате квантово-химических расчетов подтверждается предположение о наличии у соединения VMA-13-15 антирадикальной активности за счет наличия в  $\alpha$ -положении пропионового фрагмента. Для сопоставления предполагаемой выраженности антирадикальных свойств соединения VMA-13-15 рассмотрена реакция антирадикальной активности на примере фенола (реакция VI). Видно, что соединения без гидроксильного заместителя уступает фенолу почти в два раза по возможной антирадикальной активности. При этом значение энергии Гиббса в ходе взаимодействия VMA-13-15 с гидроксильным радикалом равняется  $-66.6995$  кДж/моль [30].

Таблица 53 – Значения энергии Гиббса и константы равновесия при нормальных условиях для предложенных реакций деградации *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

| Номер реакции | Энергия Гиббса ( $\Delta G$ ), кДж/моль | Константа равновесия (K) |
|---------------|---|--------------------------|
| I             | -146,7400                               | $1,1958 \times 10^{28}$  |
| II            | -212,9410                               | $5,5560 \times 10^{40}$  |
| III           | -281,5030                               | $7,3035 \times 10^{53}$  |
| IV            | 27,9660                                 | $4,4557 \times 10^{-6}$  |
| V             | -66,6995                                | $5,7870 \times 10^{12}$  |
| VI            | -125,2330                               | $9,1720 \times 10^{23}$  |

Также для оценки полноты протекания предложенных реакций деградации соединения VMA-13-15 рассчитаны значения константы равновесия (K) при нормальных условиях (таблица 53). При высоких значениях константы

равновесия химическое равновесие сдвинуто в сторону продуктов реакции, а при малых – в обратную сторону. Видно, что наиболее полно протекает реакция образования кислоты соединения VMA-13-15 в щелочной среде – реакция III. Химическое равновесие реакции IV смещено в сторону исходных соединений реакции, что согласуется с полученным значением энергии Гиббса для этой реакции [30].

## **6.2. Изучение продуктов деградации *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина**

Для оценки химической стабильности соединения VMA-13-15 были проведены стрессовые испытания с целью выявления процесса деградации и установления продуктов разложения потенциального лекарственного средства. В связи с тем, что соединения VMA-13 можно отнести к классу амидов, оно, как показали результаты компьютерного прогноза, будет подвергаться гидролитическому расщеплению. Чаще всего этот процесс катализируют ионы водорода и гидроксид-ионы [18].

Для изучения возможных продуктов деградации из предложенных нами реакций был использован метод капиллярного электрофореза. Для проведения анализа использовали водный раствор БАС. Получение продуктов деградации изучали путем термического воздействия (60°C) в присутствии хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М и натрия гидроксида раствора 0,1 М. Для этого готовили растворы по методике: 0,0100 г (точная навеска) условного стандартного образца *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляли 30 мл воды очищенной, взбалтывали до полного растворения и доводили этим же растворителем до метки. К 2,5 мл полученного раствора прибавляли равные объемы хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М, натрия гидроксида раствора 0,1 М и помещали в термостате при температуре 60°C. По окончании процесса термостатирования растворы охлаждали и при помощи микропипетки

отбирали 1000 мкл, переносили в пробирки типа Эппендорф и центрифугировали при 12000 мин<sup>-1</sup> 5 мин. Полученные растворы декантировали и подвергали анализу с помощью метода капиллярного электрофореза в условиях анализа, описанных в разделе 5.1 [30].

Первым было исследовано влияние температуры на процесс деградации. Водный раствор VMA-13-15 выдерживали в термостате при температуре 60°C. Анализ раствора проводили через 5, 10 и 15 часов термического воздействия (рисунок 29), по методике, описанной выше.

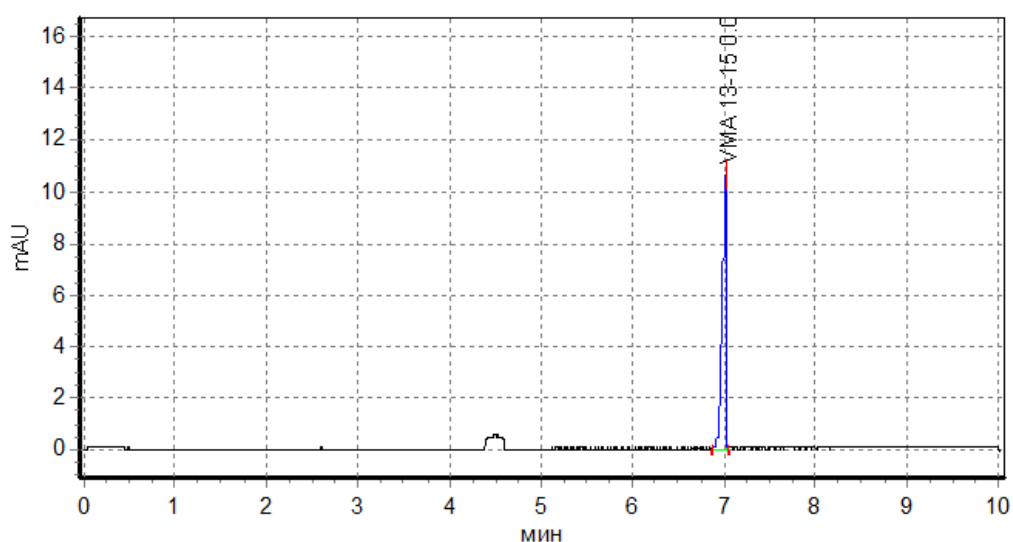


Рисунок 29 – Электрофореграмма продуктов деградации водного раствора *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина (15 часов)

Из представленной электрофореграммы (рисунок 29) следует, что при термическом воздействии на водный раствор БАС в течение 15 часов никаких изменений не происходит по сравнению с раствором, не подвергающимся процессу деградации [30].

Затем было исследовано влияние хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М на процесс деградации VMA-13-15. Анализ раствора проводили через 5, 10 и 15 часов термического воздействия.

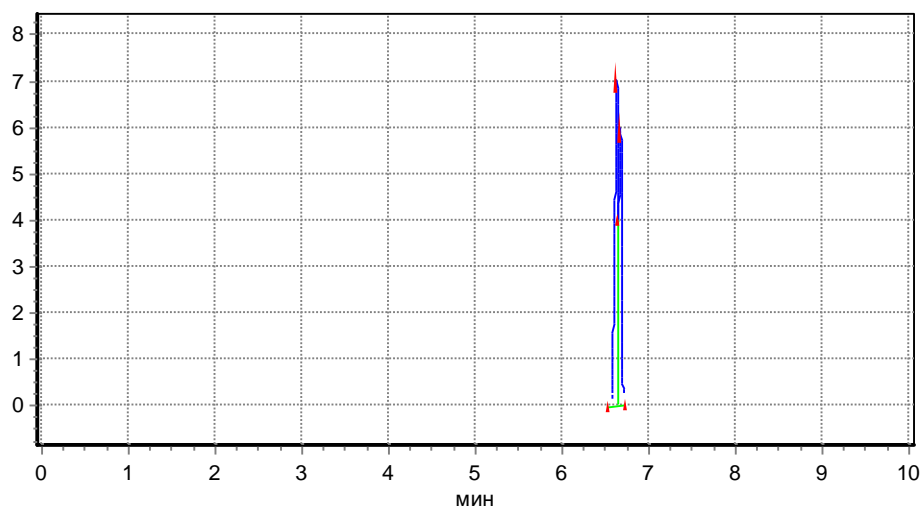


Рисунок 30 – Электрофореграмма продуктов деградации водного раствора *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина с хлористоводородной кислотой раствором 0,1 М через 10 часов термического воздействия

При воздействии на БАС хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М на электрофореграмме (рисунок 30) при времени миграции в интервале от 6,58 до 6,62 минут наблюдается появление неразделенного пика.

Следующим этапом было изучение влияния натрия гидроксида раствора 0,1 М на процесс деградации исследуемого БАС. Анализ раствора проводили через 5, 10 и 15 часов термического воздействия [30].

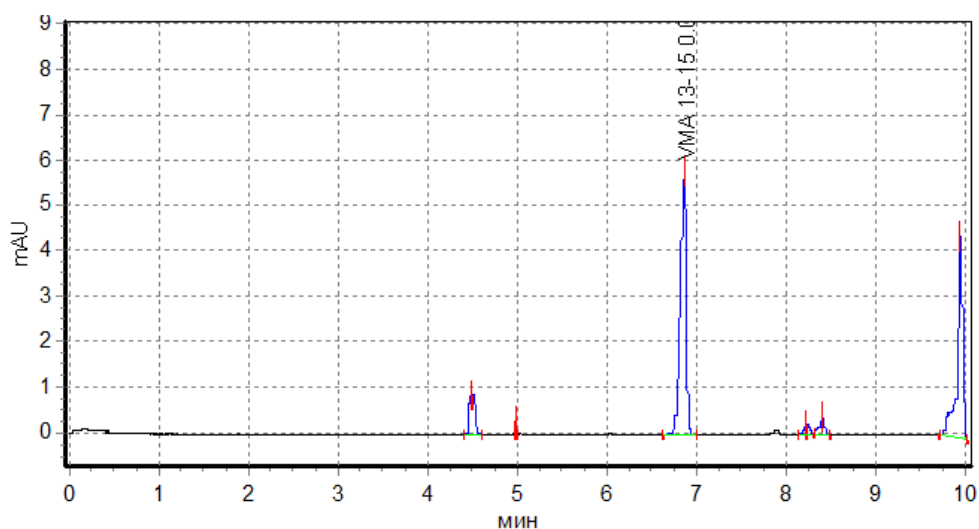


Рисунок 31 – Электрофореграмма продуктов деградации водного раствора *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина с натрия гидроксида раствором 0,1 М через 15 часов термического воздействия

При взаимодействии водного раствора БАС с натрия гидроксида раствором при нагревании наблюдали появление четырех неидентифицированных пиков (рисунок 31).

Таким образом, при использовании стресс тестов наибольшее влияние на процесс деструкции БАС в водном растворе оказывает щелочная реакция среды и значительно превышает влияние нейтральной и кислой средах. Эти данные подтверждают результаты прогнозирования возможных путей разложения исследуемого соединения с помощью компьютерных технологий, в которых отмечено, что наиболее легко и полно может протекать реакция в щелочной среде – реакция III (наибольшее значение энергии Гиббса) [30].

### **6.3. Идентификация продуктов деструкции *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии**

Ввиду того, что при изучении в качестве возможных родственных примесей как методом капиллярного электрофореза, так и методом ВЭЖХ при исследовании лабораторных образцов была обнаружена в следовых количествах примесь со временем миграции 4,5 минуты. Аналогичный пик был обнаружен нами и при использовании щелочной среды в стрессовых испытаниях. Как следует из представленных схем (раздел 6.1), данный пик можно отнести к 2-[хиназолин-3(4*H*)-ил] пропионовой кислоте. В связи с этим представляет интерес провести идентификацию возможных продуктов деградации, которые могут появляться в БАС в первую очередь.

Как свидетельствуют данные, описанные в главе 5, раздел 5.4, на хроматограмме (рисунок 32) лабораторного образца (2017) наблюдается незначительный пик со временем удерживания 4,52, который оказался идентичным по времени миграции исходному веществу, используемому для синтеза [30].

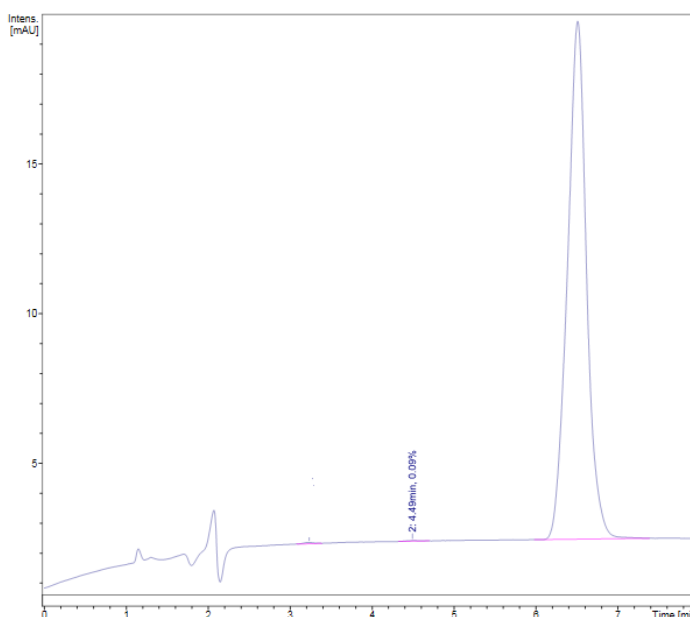


Рисунок 32 – Хроматограмма лабораторного образца (2017) *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

Для подтверждения структуры данного соединения проводили ВЭЖХ-МС анализ с использованием хроматографа DionexUltimate 3000 (ThermoScientific, США). Использовали колонку PhenomenexLunaC18\2 (5 мкм, 150x4,6 мм, Phenomenex, США). Подвижная фаза представляет собой смесь ацетонитрила и 0,5% муравьиной кислоты в соотношениях 20:80. Скорость потока составила 0,5 мл/мин, объем пробы – 20 мкл.

МС-детектирование осуществляли методом ионизации электрораспылением (ESI) с использованием спектрометра BrukerAmazonSL (Bruker, США). Масс-спектр регистрировали в режиме положительной ионизации в диапазоне 50-300 *m/z*. Напряжение на капилляре – 4,5 кВ, температура интерфейса – 250°C, скорость газа-осушителя – 10 л/мин, газ ионной ловушки – гелий (давление 30 psi) (рисунок 33) [30].

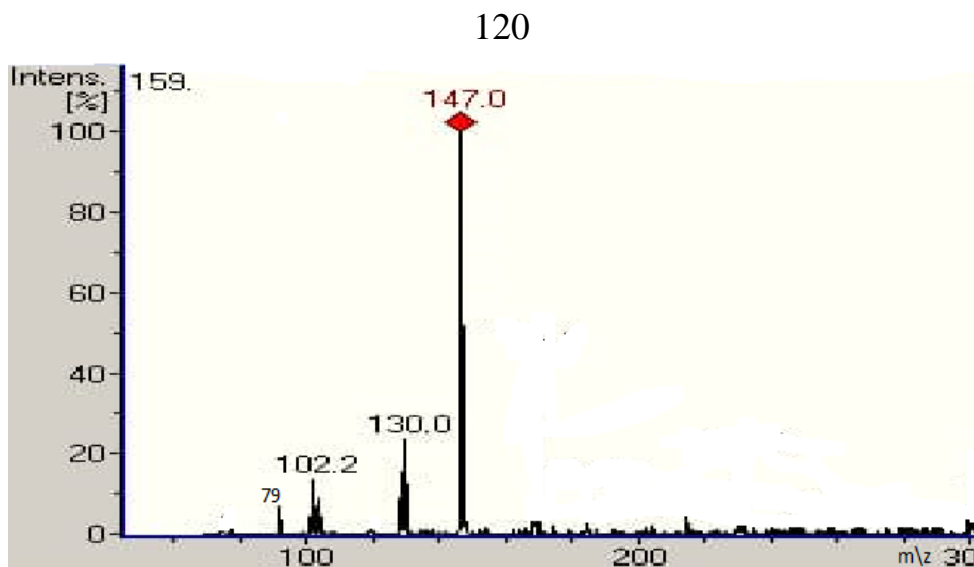


Рисунок 33 – Масс-спектр предполагаемой примеси незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она (Характеристичные  $m/z$  (интенсивность): 147(100),130(25),102(18),79(8))

Идентификацию незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она проводили по значениям времени удерживания, данным [pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov). Обработку первичных данных проводили в программе Compass Data Analysis (рисунок 34).

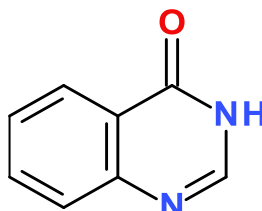


Рисунок 34 – Структурная формула незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она

В результате совпадения времени удерживания (4,46) и характеристикам масс-спектра (М.м 147) продукт деструкции был идентифицирован как незамещенный хиназолин-4(3*H*)-он (М.м 146,146) [30].

#### 6.4. Установление срока годности методом ускоренных испытаний N-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

Изучение сроков годности проводили согласно требованиям ГФ РФ

15 издания (ОФС.1.1.0009) [18]. Исследование проводили на трех лабораторных образцах серии 2021 (I, II, III), которые помещали в склянки с плотно закупоренными крышками в термостат, позволяющий автоматически поддерживать температуру (60°C). Контроль качества проводили через временные промежутки (7,5 дней) равным 6 месяцам хранения в естественных условиях.

В соответствии с ОФС.1.1.0009 контроль качества исследуемых образцов субстанции *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина проводили по показателям, установленным в ходе проведения эксперимента, описанного в главах 2-5. Предлагаемые показатели контроля качества БАС представлены в таблице 54. Методики определения показателей качества легли в основу проекта нормативной документации (*приложение Ж*).

Таблица 54 – Нормы качества *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина, контролируемые при установлении срока годности

| Показатели                            | Методы   | Нормы   |
|---------------------------------------|--|---|
| <b>Описание</b>                       | Органолептический<br>ОФС.1.1.0006.15   | Белый аморфный порошок, без запаха  |
| <b>Подлинность</b>                    | ИК-спектроскопия<br>ОФС.1.2.1.1.0002.15  | ИК-спектр БАС, снятый в диске с калия бромидом, в области от 4000 до 400 см <sup>-1</sup> по положению полос поглощения должен соответствовать спектру СО |
|                                       | УФ-спектрофотометрия<br>ОФС.1.2.1.1.0003.15                                      | Спектр поглощения 0,001% водного раствора БАС области длин волн от 200 до 400 нм должен иметь максимумы поглощения при 226±2 нм, 266±2 нм, 302±2 нм       |
| <b>Потеря в массе при высушивании</b> | Способ 1 в соответствии с требованиями ГФ XIV<br>ОФС.1.2.1.0010.15               | Не более 0,5%   |
| <b>Температура плавления</b>          | Капиллярный метод в соответствии с требованиями ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.1.0011.18 | От 268°C до 270°C   |
| <b>Родственные примеси</b>            | Капиллярный электрофорез   | Не более 0,1%   |
| <b>Количественное содержание</b>      | Кислотно-основное титрование в среде неводного растворителя<br>ОФС.1.2.3.0014.15 | Не менее 99,0% (в пересчете на сухое вещество)  |

Результаты исследования показали, что БАС остается стабильным в течение 37,5 суток экспериментального хранения, что позволяет установить предварительный срок годности 2 года (таблица 55).

По формуле, представленной в ОФС «Стабильность и сроки годности лекарственных средств», рассчитали температуру хранения, позволяющую обеспечить установленный срок годности:

$$t_{\text{xp}} = t_{\text{э}} + \frac{10}{\lg A} * \lg \frac{C_{\text{э}}}{C} = 60 + \frac{10}{\lg 2,5} * \lg \frac{30}{730} = 25^{\circ}\text{C}$$

Таким образом, в результате проведения эксперимента установлен предварительный срок годности (2 года) и температурный режим хранения БАС.

Таблица 55 – Результаты установления срока годности БАС методом ускоренных испытаний

| Серия<br>2021 | Дата<br>анализа –<br>февраль-<br>март<br>2021 | Описание      | Подлинность              |                      | Температура<br>плавления,<br>С° | Потеря в<br>массе при<br>высушивании,<br>% | Родственные<br>примеси | Количественное<br>содержание |
|---------------|---|---------------|--------------------------|----------------------|---------------------------------|--|------------------------|------------------------------|
|               |   |               | УФ-<br>спектрофотометрия | ИК-<br>спектроскопия |                                 |  |                        |                              |
| I             | 1.02  | Соответствует | Соответствует            | Соответствует        | 269-270                         | 0,3789                                     | Менее 0,1%             | 99,32                        |
|               | 8.02  | Соответствует | Соответствует            | Соответствует        | 268-270                         | 0,3593                                     | Менее 0,1%             | 100,22                       |
|               | 15.02   | Соответствует | Соответствует            | Соответствует        | 268-269                         | 0,4219                                     | Менее 0,1%             | 99,86                        |
|               | 23.02   | Соответствует | Соответствует            | Соответствует        | 268-270                         | 0,4617                                     | Менее 0,1%             | 99,98                        |
|               | 02.03   | Соответствует | Соответствует            | Соответствует        | 269-270                         | 0,2974                                     | Менее 0,1%             | 100,49                       |
|               | 10.03   | Соответствует | Соответствует            | Соответствует        | 268-269                         | 0,3388                                     | Менее 0,1%             | 100,08                       |
| II            | 1.02  | Соответствует | Соответствует            | Соответствует        | 268-270                         | 0,3978                                     | Менее 0,1%             | 99,28                        |
|               | 8.02  | Соответствует | Соответствует            | Соответствует        | 268-270                         | 0,3699                                     | Менее 0,1%             | 100,34                       |
|               | 15.02   | Соответствует | Соответствует            | Соответствует        | 268-269                         | 0,3885                                     | Менее 0,1%             | 98,89                        |
|               | 23.02   | Соответствует | Соответствует            | Соответствует        | 268-270                         | 0,4123                                     | Менее 0,1%             | 101,03                       |
|               | 02.03   | Соответствует | Соответствует            | Соответствует        | 269-270                         | 0,4874                                     | Менее 0,1%             | 100,61                       |
|               | 10.03   | Соответствует | Соответствует            | Соответствует        | 268-269                         | 0,4431                                     | Менее 0,1%             | 100,37                       |
| III           | 1.02  | Соответствует | Соответствует            | Соответствует        | 268-270                         | 0,3961                                     | Менее 0,1%             | 99,13                        |
|               | 8.02  | Соответствует | Соответствует            | Соответствует        | 269-270                         | 0,4274                                     | Менее 0,1%             | 100,25                       |
|               | 15.02   | Соответствует | Соответствует            | Соответствует        | 268-269                         | 0,4158                                     | Менее 0,1%             | 100,93                       |
|               | 23.02   | Соответствует | Соответствует            | Соответствует        | 269-270                         | 0,3879                                     | Менее 0,1%             | 100,21                       |
|               | 02.03   | Соответствует | Соответствует            | Соответствует        | 268-270                         | 0,4462                                     | Менее 0,1%             | 99,15                        |
|               | 10.03   | Соответствует | Соответствует            | Соответствует        | 268-270                         | 0,4183                                     | Менее 0,1%             | 100,04                       |

### **6.5. Долгосрочные испытания стабильности *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина**

Изучение стабильности БАС проводили также методом долгосрочных испытаний. Для этого 2 серии 2019 года и 1 серию 2017 VMA-13-15 хранили в банках темного стекла с плотно укупоренными крышками в сухом, защищенном от света месте. Контроль качества образцов провели в марте 2021 года, после установления показателей норм качества. Оказалось, что все образцы соответствуют установленным показателям качества. Однако в образце 2017 года при проверке показателя «Родственные примеси» наблюдали появление следовых количеств исходного соединения синтеза незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она. Полученные данные подтверждают, что при хранении в естественных условиях показатели качества стабильны в течение заявленных 2 лет (раздел 6.4).

### **Заключение по главе 6**

1. С помощью компьютерных технологий спрогнозированы возможные процессы деградации, рассчитаны их термодинамические характеристики.
2. В ходе проведения стрессовых испытаний путем изучения влияния термического воздействия на водные растворы БАС в присутствии хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М и натрия гидроксида раствора 0,1 М с помощью капиллярного электрофореза установлено, что наибольшее влияние на стабильность водных растворов *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина оказывает щелочная реакция среды.
3. Получен масс-спектр исходного соединения синтеза незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она. По совпадению молярной массы и времени удерживания было подтверждено, что примесь на хроматограммах *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина является незамещенным хиназолин-4(3*H*)-оном.
4. Изучена и обоснована стабильность исследуемой субстанции методом

ускоренных испытаний. Установлен предварительный срок годности – 2 года. Данный срок годности подтвержден в условиях долгосрочных испытаний стабильности исследуемой субстанции. Рассчитан температурный режим хранения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенного комплексного фармацевтического исследования предложено решение актуальной научно-практической задачи и стандартизации по основным физическим, химическим и физико-химическим показателям нового биологически активного соединения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина (VMA-13-15). На основании изученных химических свойств и физико-химических характеристик БАС установлены показатели контроля качества и подготовлен проект фармакопейной статьи на субстанцию. Полученные результаты приведены в общих выводах.

## ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Изучены физико-химические свойства *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина, послужившие основой нормируемых фармакопейных показателей качества субстанции, включенных в проект НД. Установлено, что соединение растворимо в водных растворах, ДМФА, мало растворимо в метаноле и спирте этиловом и практически нерастворимо в неполярных растворителях. Интервал температуры плавления находится в пределах от 268°C до 270°C.

2. Обоснована возможность использования методов ИК-спектromетрии по совпадению положения и интенсивности полос поглощения со спектром УСО и УФ-спектрофотометрии (УФ-спектр поглощения водного раствора БАС должен иметь максимумы поглощения при 226+2 нм, 266+2 нм, и 302+2 нм), а также качественной реакции на остаток гуанидина для идентификации и подтверждения подлинности *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина.

3. Разработаны и валидированы методики количественного определения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методами кислотно-основного титрования в среде уксусной кислоты ледяной с потенциометрическим определением точки эквивалентности и УФ-спектрофотометрии с использованием в качестве растворителя воды очищенной или спирта этилового 96%.

4. Оптимизированы условия определения *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом капиллярного электрофореза: электролит – боратный буферный раствор 0,01 М с рН 9,2, длина волны 268 нм и доказана их пригодность для определения подлинности и количественного содержания исследуемой субстанции.

5. Разработаны и валидированы методики количественного определения содержания основного вещества методом ВЭЖХ: сорбент октадецилсиликагель, подвижная фаза ацетонитрил – 0,5% муравьиная кислота в соотношении 20:80, изократический режим, скорость потока элюента 1,0 мл в минуту и длина волны

детектирования 254 нм.

6. Доказана возможность использования методов ВЭЖХ и КЭ для определения и установления количественного содержания родственной примеси – незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она. Разработана и валидирована методика его количественного определения. Нормировано содержание примеси не более 0,1%. Разработана методика количественного определения остаточных органических растворителей методом газовой хроматографии на модельных смесях с использованием стандартных растворов искомым растворителей. Методика валидна и позволяет определять содержание метанола и диэтилового эфира в количестве не более 0,5%.

7. Изучена стабильность молекулы исследуемого *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина и на основе компьютерных технологий спрогнозированы возможные процессы деструкции, среди которых наиболее вероятным может быть реакция гидролиза при термостатировании раствора исследуемого соединения в щелочной среде. Прогностические данные экспериментально подтверждены методом капиллярного электрофореза путем анализа деградации водного раствора исследуемого соединения посредством «стресс-тестов». Установлен предварительный срок годности – 2 года при температуре не выше 25 градусов.

8. Установлены нормы качества и оформлен проект НД на субстанцию *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина на основании полученных результатов и нормативных требований.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты, представленные в диссертационной работе, позволяют рекомендовать *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидин для дальнейшего более глубокого фармацевтического анализа с целью разработки на его основе кардиопротекторных и нейропротекторных лекарственных средств и внедрения их в промышленное производство.

**ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

Перспективой развития темы является разработка эффективных лекарственных средств на основе *N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина, обладающих кардиопротекторным и нейропротекторным действием, с целью решения актуальных проблем медицинской практики в борьбе с патологиями сердечно-сосудистой системы.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

БАС – биологически активное соединение

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГХ – газовая хроматография

КЭ – капиллярный электрофорез

ГФ РФ XIV – Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания

ГФ РФ XV – Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания

ИК-область – инфракрасная область спектра

ИК-спектр – спектр поглощения в инфракрасной области

ИК-спектрометрия – спектрометрия в инфракрасной области

НД – нормативный документ

ОФС – общая фармакопейная статья

УСО – условный стандартный образец

УФ-область – ультрафиолетовая область спектра

УФ-спектр – спектр поглощения в ультрафиолетовой области

УФ-спектрофотометрия – спектрофотометрия в ультрафиолетовой области

ФС – фармакопейная статья

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абышев, А.З. Спектральные методы в фармацевтической химии: (применение УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии в анализе лекарственных веществ) / А.З. Абышев, С.Н. Трусов. – СПб.: Санкт-Петербургская гос. хим.-фармац. акад., 2011. – 279 с.
2. Артамонова, З.Н. Судебно-химическое исследование трупного материала методом хроматографии в тонком слое сорбента при отравлении лекарственными веществами кислого, нейтрального и основного характера / З.Н. Артамонова, Р.Р. Краснова, Г.М. Путиева // Перспективы развития и совершенствования судебно-медицинской науки и практики: материалы 6 Всероссийского съезда судебных медиков, посвященного 30-летию Всероссийского общества судебных медиков. – М., Тюмень: Академия, 2005. – С. 166-168.
3. Белик, В.В. Физическая и коллоидная химия: учебник для студ. учреждений сред. проф. образования / В.В. Белик, К.И. Киенская. – 9-е изд., стер. – М.: Академия, 2015. – 288 с.
4. Бузланова, М.М. Фотометрическое определение полигексаметиленгуанидина в водных растворах в виде комплекса с иодом / М.М. Бузланова, И.В. Каранди // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2003. – Т. 69, № 4. – С. 18-19.
5. Валидация аналитических методик: теория и практика (часть i) / П. Носырев, М. Носырева, Т. Рассказова, Н. Корнеева // Ремедиум. – 2003. – № 10. – С. 69-71.
6. Валидация методики количественного определения ЛХС-1208 в лиофилизированной форме / И.Д. Гулякин [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. – № 3. – С. 118-122.
7. Волокитина, Д.С. Применение производной спектрофотометрии для определения нового биологически активного соединения производного хиначолина в таблетках / Д.С. Волокитина, Д.С. Лазарян, С.В. Волокитин //

Здоровье и образование в XXI веке. – 2017. – Т. 19, № 9. – С. 215-218.

8. Волокитина, Д.С. Разработка и валидация методики количественного определения субстанции нового биологически активного соединения производного хиназолин-4(3H)-она методом кислотно-основного титрования в неводной среде / Д.С. Волокитина, Д.С. Лазарян, С.В. Волокитин // Евразийский союз ученых. – 2018. – № 11-3(56). – С. 39-42.

9. Волокитина, Д.С. Разработка способов анализа и стандартизация нового биологически активного соединения производного хиназолин-4(3H)-она ноотропного действия: дис. ... канд. фармацевт. наук: 14.04.02 / Д.С. Волокитина. – М., 2019. – 24 с.

10. Волокитина, Д.С. Разработка способов определения подлинности биологически активной субстанции производной хиназолина / Д.С. Волокитина, Д.С. Лазарян, С.В. Волокитин // Здоровье и образование в XXI веке. – 2017. – Т. 19, № 6. – С. 142-145.

11. ВЭЖХ и СВЭЖХ как методы для определения лекарственных веществ в крови (обзор) / Ю.В. Медведев, Г.В. Раменская, И.Е. Шохин, Т.А. Ярушок // Хим.-фармац. журн. – 2013. – Т. 47, № 4. – С. 45-51.

12. Вязьмин, С.Ю. Электронная спектроскопия органических соединений / С.Ю. Вязьмин, Д.С. Рябухин, А.В. Васильев. – СПб.: СПбГЛТА, 2011. – 43 с.

13. Гаспарян, А.Ю. Клиническая эффективность триметазида как основного сердечно-сосудистого препарата метаболического действия / А.Ю. Гаспарян, А.Г. Петросян, Л.М. Айвазян // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2008. – Т. 7, № 4. – С. 101-106.

14. Гендугов, Т.А. Изучение физико-химических свойств нового производного хиназолин-4(3H)-она психотропного действия / Т.А. Гендугов // Евразийский союз ученых. – 2019. – № 11-2(68). – С. 48-51.

15. Глухова, Е.Г. Синтез и фармакологические свойства новых карбонильных производных хиназолин-4(3H)-она: автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук: 14.04.02 / Е.Г. Глухова. – Пятигорск, 2016. – 23 с.

16. Глущенко, В.А. Сердечно-сосудистая заболеваемость – одна из

важнейших проблем здравоохранения / В.А. Глущенко, Е.К. Иркиенко // Медицина и организация здравоохранения. – 2019. – Т. 4, № 1. – С. 56-63.

17. Государственная фармакопея Российской Федерации [Электронный ресурс]. 14-е изд. – Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (дата обращения: 06.06.2022).

18. Государственная фармакопея Российской Федерации. 15-е изд. – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации.

19. Губен-Вейль. Методы органической химии. Т. 2. Методы анализа / Губен-Вейль. – 2-е изд., стереотип. – М.: Химия, 1967. – 1032 с.

20. Гунина, Л. Кардиопротекторы прямого действия в спорте: настоящее и будущее / Л. Гунина, В. Костенко // Наука в олимпийском спорте. – 2016. – № 4. – С. 44-58.

21. Гурова, Н.А. Поиск и изучение ингибиторов  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обменника среди производных хиназолина, содержащих свободную гуанидиновую группу / Н.А. Гурова, А.А. Озеров, В.В. Гурова // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2018. – Т. 81, № 5. – С. 66.

22. Дидух-Шадрина, С.Л. Сорбционно-фотометрическое и тест-определение  $\text{Fe(III)}$  в природных водах с использованием кремнезема, послонно модифицированного полигексаметиленгуанидином и ферроном / С.Л. Дидух-Шадрина, О.В. Буйко, В.Н. Лосев // Журн. Сиб. федерал. ун-та. Серия: Химия. – 2020. – Т. 13, № 3. – С. 349-362.

23. Езерская, А.А. Капиллярный электрофорез: основные принципы, применение в фармацевтическом анализе / А.А. Езерская, М.Л. Пивовар // Вестн. фармации. – 2019. – № 1(83). – С. 35-44.

24. Жебентяев, А.И. Аналитическая химия. Химические методы анализа: учебное пособие / А.И. Жебентяев, А.К. Жерносек, И.Е. Талуть. – 2-е изд. – Минск: Новое знание; ИНФРА-М, 2020. – 542 с.

25. Защита миокарда крыс селективным ингибитором  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обмена и ишемическим прекондиционированием / О.П. Писаренко [и др.] // Кардиология. – 2005. – Т. 45, № 2. – С. 37-44.

26. Зверев, Я.Ф. Ингибирование  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмена как новый подход к защите миокарда от ишемического и реперфузионного повреждения / Я.Ф. Зверев, В.М. Брюханов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2003. – Т. 2, № 3. – С. 16-34.

27. Изложение методик высокоэффективной жидкостной хроматографии в стандартах качества лекарственных средств / И.В. Сакаева [и др.] // Ведомости Науч. центра экспертизы средств мед. применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. – 2014. – № 1. – С. 4-14.

28. Изучение возможности идентификации нового биологически активного вещества кардиопротекторного действия / Е.В. Компанцева, Д.Н. Луценко, И.П. Кодониди, Н.М. Червонная // Вестн. Смоленск. гос. мед. акад. – 2020. – Т. 19, № 2. – С. 185-190.

29. Изучение показателей чистоты нового биологически активного соединения ПМФИ-195 / Б.В. Боровский, Н.О. Коваль, В.А. Компанцев, Я.П. Кодониди // Вестн. науки и образования. – 2019. – № 1-2(55). – С. 82-85.

30. Изучение стабильности биологически активного соединения N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина с использованием электрофореза и масс-спектрометрии / Д.Н. Луценко, Е.В. Компанцева, А.С. Чиряпкин [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2024. – Т. 24, № 2. – С. 257-267.

31. Использование метода тонкослойной хроматографии для определения верапамила гидрохлорида, лизиноприла дигидрата и продуктов их деструкции при совместном присутствии / Е.В. Компанцева, А.В. Бабьяк, Л.П. Мыкоц, С.Г. Тираспольская // Науч. ведомости Белгород. гос. ун-та. Серия: Медицина. Фармация. – 2012. – № 16(135). – С. 123-127.

32. Каранди, И.В. Потенциометрическое определение солей полигексаметиленгуанидина с тетрафенилборатом натрия / И.В. Каранди, М.М. Бузланова // Завод. лаборатория. Диагностика материалов. – 2011. – Т. 77, № 3. – С. 25-26.

33. Кардиология: Национальное руководство / Под ред. Ю.Н. Беленкова, Р.Г. Оганова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 848 с.

34. Кардиопротекторы / И.С. Чекман [и др.]. – Киев: Наук. думка, 2005. – 204 с.
35. Качественный анализ лекарственных средств: учебное пособие / Т.Ю. Арчинова [и др.]. – Пятигорск: ГОУ ВПО Пятигорская ГФА Росздрава, 2007. – 181с.
36. Ковалев, И.П. Инфракрасные спектры поглощения некоторых групп природных соединений: атлас спектров / И.П. Ковалев, Е.В. Титов. – Харьков: Изд-во Харьков гос ун-та, 1966. – С. 18-20.
37. Коваль, Н.О. Идентификация и установление подлинности нового биологически активного соединения ПМФИ-195 с использованием хромогенных реакций / Н.О. Коваль // Вестн. науки и образования. – 2019. – № 12-1(66). – С. 105-107.
38. Коваль, Н.О. Оптимизация синтеза, изучение физико-химических свойств, разработка методик анализа и стандартизация нового производного о-бензоиламинобензойной кислоты – 2-бензоиламино-N-[4-(4,6-диметилпиримидин-2-илсульфамоил)-фенил]-бензамида: дис. ... канд. фармацевт. наук: 3.4.2. / Н.О. Коваль. – Пятигорск, 2023. – 185 с.
39. Кодониди, И.П. Молекулярное конструирование и целенаправленный синтез N-замещенных производных 4-оксо-1,4-дигидропиримидина на основе тормозных нейромедиаторов / И.П. Кодониди [и др.] // Хим.-фармац. журн. – 2009. – Т. 43, № 10. – С. 32-39.
40. Козлов, И.А. Фармакологическая кардиопротекция: что нового? / И.А. Козлов // Вестн. анестезиологии и реаниматологии. – 2019. – Т. 16, № 2. – С. 57-66.
41. Количественный анализ лекарственных средств неорганической природы: учебное пособие/ Е.А. Илларионова, И.П. Сыроватский. – Иркутск: ИГМУ, 2014. – 77 с.
42. Компанцева, Е.В. Определение биологически активного соединения N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом капиллярного электрофореза / Е.В. Компанцева, Д.Н. Луценко, Е.Р. Гарсия // Вопр. биол. и хим. науки. – 2019. – Т. 56, № 1. – С. 10-14.

мед. и фармац. химии. – 2020. – Т. 23, № 10. – С. 40-45.

43. Компанцева, Е.В. Определение остаточных органических растворителей в новом кардиопротекторном соединении методом газовой хроматографии / Е.В. Компанцева, Д.Н. Луценко, М.В. Ларский // Вопр. биологич., мед. и фармац. химии. – 2021. – Т. 24, № 10. – С. 52-58.

44. Компанцева, Е.В. Разработка и валидация методики количественного определения биологически активного соединения *n*-(2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил)гуанидина / Е.В. Компанцева, Д.Н. Луценко, А.А. Глушко // Аспирантский вестн. Поволжья. – 2019. – № 5-6. – С. 122-127.

45. Компанцева, Е.В. Спектрофотометрическое определение нового биологически активного соединения кардиопротекторного действия / Е.В. Компанцева, Д.Н. Луценко // Беликовские чтения. Материалы 7 Всерос. науч.-практич. конф. – Пятигорск, 2019. – С. 246-252.

46. Краснова, Р.Р. Химико-токсикологический анализ лекарственных веществ в крови (плазме, сыворотке) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / Р.Р. Краснова, Н.А. Крупина, Р.Н. Пашовкина // Перспективы развития и совершенствования судебно-медицинской науки и практики: материалы 6 Всерос. съезда судебных медиков. – М., Тюмень: Академия, 2005. – С. 173-175.

47. Крейнгольд, С.У. Определение полигексаметиленгуанидина в присутствии алкилдиметилбензиламмония / С.У. Крейнгольд, А.Н. Кочетов, К.А. Шестаков // Вестн. МИТХТ. – 2006. – Т. 1, № 1. – С. 63-65.

48. Крешков, А.П. Основы аналитической химии. Теоретические основы. Количественный анализ / А.П. Крешков. – М.: Химия, 1976. – 480 с.

49. Ленская, К.В. Циклические гуанидины – новый класс гипогликемических средств: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 14.03.06 / К.В. Ленская. – Волгоград, 2018. – 47 с.

50. Луценко, Д.Н. Валидационная оценка методики количественного определения субстанции *N*-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом УФ-спектрофотометрии / Д.Н. Луценко // Проблемы и перспективы в

международном трансфере инновационных технологий: сб. ст. Междунар. науч.-практич. конф. (25 сент. 2018 г.). – Уфа: Аэтерна, 2018. – С. 93-98.

51. Луценко, Д.Н. Изучение физико-химических свойств субстанции нового биологически активного соединения производного хиназолин-4(3H)-она / Д.Н. Луценко, Е.В. Компанцева // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. – Пятигорск, 2018. – Вып. 73. – С. 24-26.

52. Луценко, Д.Н. Спектрофотометрическое определение нового биологически активного соединения кардиопротекторного действия / Д.Н. Луценко, Е.В. Компанцева // Беликовские чтения: Материалы 7 Всерос. науч.-практич. конф. (04–05 дек. 2018 г.). – Пятигорск, 2019. – С. 246-252.

53. Люсов, В.А. Инфаркт миокарда / В.А. Люсов, Н.А. Волон, И.Г. Гордеев. – М.: Литтерра, 2010. – 240 с.

54. Методологические подходы к выбору методов установления подлинности лекарственных средств / А.И. Лутцева [и др.] // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. – 2017. – Т. 7, № 2. – С. 71-76.

55. Минкин, В.И. Строение молекул / В.И. Минкин, Б.Я. Симкин, Р.М. Миняев. – Ростов н/Д: Феникс, 1997. – 560 с.

56. Митькина, Л.И. Подходы к оценке пригодности аналитических методик при проведении экспертизы качества лекарственных средств / Л.И. Митькина, Е.Л. Ковалева // Ведомости Науч. центра экспертизы средств мед. применения. Регуляторные исследования и экспертиза лек. средств. – 2012. – № 2. – С. 6-9.

57. Мищенко, Е.С. Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии в анализе новой субстанции VMA-10-18 / Е.С. Мищенко, Д.С. Лазарян, А.Д. Лазарян // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2021. – Т. 10, № 3. – С. 76-81.

58. Мищенко, Е.С. Разработка и валидация методики количественного определения новой субстанции / Е.С. Мищенко, Д.С. Лазарян, А.А. Озеров //

Фармация. – 2019. – Т. 68, № 7. – С. 11-15.

59. Мищенко, Е.С. Разработка методики определения количественного содержания новой субстанции, производной хиназолин-4(3Н)-она, методом УФ-спектрофотометрии / Е.С. Мищенко, А.Д. Лазарян, Т.Т. Лихота // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2020. – Т. 9, № 1. – С. 30-34.

60. Мищенко, Е.С. Стандартизация биологически активного соединения производного хиназолин-4(3Н)-она методом тонкослойной хроматографии / Е.С. Мищенко, Д.С. Лазарян // Беликовские чтения: Материалы 7 Всерос. науч.-практич. конф. (04–05 дек. 2018 г.). – Пятигорск, 2019. – С. 259-263.

61. Мищенко, Е.С. Разработка методик анализа для стандартизации биологически активного соединения производного хиназолин-4(3Н)-она: автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук: 3.4.2. / Е.С. Мищенко. – Пятигорск, 2022. – 24 с.

62. Неспецифические примеси в фармацевтических субстанциях: особенности методик их определения / Ю.Р. Биглова [и др.] // Ведомости Науч. центра экспертизы средств мед. применения. Регуляторные исследования и экспертиза лек. средств. – 2019. – Т. 9, № 3. – С. 153-161.

63. Овсянкина, Н.В. Влияние ингибиторов натрий-водородного обменника 1 изоформы зонипорида и соединения ВМА-1321 на уровень малонового диальдегида в митохондриях сердца животных с экспериментальной сердечной недостаточностью / Н.В. Овсянкина, Р.К. Магомедов // Актуальные проблемы эксперим. и клинич. медицины: материалы 77-й Междунар. науч.-практич. конф. молодых ученых и студентов (24–27 апр. 2019 г.). – Волгоград, 2019. – С. 381-382.

64. Определение остаточных органических растворителей в субстанции 2-бензоиламино-п-[4-(4,6-диметилпиримидин-2-илсульфамоил)-фенил]-бензамида методом ГЖХ / Б.В. Боровский [и др.] // Вопр. биологич., мед. и фармац. химии. – 2021. – Т. 24, № 4. – С. 15-23.

65. Определение посторонних примесей в субстанции диборнола методом ВЭЖХ / Е.Е. Назмутдинова [и др.] // Журн. Сиб. федерал. ун-та. Серия: Химия. – 2010. – Т. 3, № 3. – С. 260-267.

66. Определение содержания полимерных производных гуанидина в антисептических средствах методом двухфазного титрования / О.И. Коцур, Л.А. Носикова, К.А. Шестаков, А.Н. Кочетов // Тонкие химич. технологии. – 2015. – Т. 10, № 2. – С. 20-24.

67. Определение N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина и его родственной примеси методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / Д.Н. Луценко, А.С. Чиряпкин, Е.В. Компанцева [и др.] // Вопр. обеспечения качества лекарственных средств. – 2024. – № 1(43). – С. 33-40.

68. Особенности строения гуанидинсодержащих мономеров и полимеров по данным ИК-спектроскопии / Ю.А. Малкандуев [и др.] // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказ. регион. Серия: Естественные науки. – 2006. – № 4(136). – С. 66-71.

69. Патент № 2487346 Российская Федерация, МПК G 01 N 31/22, G 01 N 21/78. Способ количественного определения производных гуанидина : № 2011134191/15 : заявл. 15.08.2011 : опубл. 10.07.2013, Бюл. № 19 / Калашников В.П., Сливкин А.И., Яковлев Л.Ю.

70. Патент № 2622638 Российская Федерация, МПК C 07 D 239/90, A 61 P 9/10, A 61 P 25/28. Производные хиназолин-4(3H)-она, обладающие нейро- и кардиопротекторной активностью : № 2016129010 : заявл. 14.07.2016 : опубл. 19.06.2017, Бюл. № 17 / Петров В.И. [и др.].

71. Патент № 826240 Союз Советских Социалистических Республик, МПК G 01 № 33/48. Способ определения гуанидина и его солей : № 2799301/28-13 : заявл. 16.08.1979 : опубл. 30.04.1981, Бюл. № 16 / Кравченя Н.А., Степура И.И., Солодунов А.А.

72. Поиск ингибиторов Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-обменника среди пиримидиновых производных гуанидина / Н.А. Гурова, А.А. Спасов, В.В. Вишневская, А.А. Озеров // Инновационные технологии в фармации. – 2019. – № 6. – С. 408-412.

73. Разработка и валидация метода контроля «разветвленного олигогексаметиленгуанидин гидрохлорида» в глазных каплях на его основе /

Д.О. Шаталов [и др.] // Бутлеровские сообщения. – 2014. – Т. 38, № 4. – С. 53-57.

74. Разработка и валидация метода контроля мономерной примеси гидрохлорида гуанидина в фармацевтической субстанции «разветвленный гидрохлорид олигогексаметиленгуанидина» / С.А. Кедик [и др.] // Вестн. МИТХТ им. М.В. Ломоносова. – 2014. – Т. 9, № 2. – С. 32-36.

75. Разработка и валидация методики количественного определения в таблетках нового вещества ноотропного действия методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / Д.С. Волокитина, Д.С. Лазарян, С.В. Волокитин, А.В. Морозов // Евразийское науч. объединение. – 2019. – № 1-3(47). – С. 133-135.

76. Разработка и валидация методики количественного определения нового биологически активного соединения N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина методом титрования в неводной среде / Д.Н. Луценко, Е.В. Компанцева, А.С. Чиряпкин, Л.С. Ушакова // Вопр. биол. хим. и фармац. химии. – 2023. – Т. 26, № 9. – С. 33-38.

77. Разработка и валидация методики количественного определения субстанции 3-[2-(4-фенил-1-пиперазино)-2-оксоэтил]-хиназолин-4(3H)-она методом потенциометрического титрования в неводной среде / Т.А. Гендугов, А.А. Глушко, А.А. Озеров, Л.И. Щербакова // Волгоград. науч.-мед. журн. – 2019. – № 4. – С. 39-42.

78. Разработка и валидация методики количественного определения фенибута в микрокапсулах / Ю.А. Полковникова [и др.] // Хим.-фармац. журн. – 2018. – № 9. – С. 56-60.

79. Разработка и валидация методики количественного определения цифетрилина в таблетках / З.С. Шпрах [и др.] // Рос. биотерапевт. журн. – 2016. – Т. 15, № 3. – С. 55-61.

80. Разработка и валидация методики определения родственных примесей в субстанции нового биологически активного соединения ноотропного действия – VMA-10-13 / Д.С. Волокитина, Д.С. Лазарян, С.В. Волокитин, А.В. Морозов // Здоровье и образование в XXI веке. – 2018. – Т. 20, № 12. – С. 184-188.

81. Разработка и валидация спектрофотометрической методики

количественного анализа субстанции нового биологически активного соединения 3-[2-(4-фенил-1-пиперазино)-2-оксоэтил]-хиназолин-4(3H)-она / Т.А. Гендугов, Л.И. Щербакова, А.А. Озеров, А.А. Глушко // *Вопр. биологич., мед. и фармац. химии.* – 2020. – Т. 23, № 4. – С. 50-55.

82. Разработка и валидация спектрофотометрической методики количественного определения субстанции нового биологически активного соединения производного хиназолин-4(3H)-она / Д.С. Волокитина, А.А. Озеров, Д.С. Лазарян, С.В. Волокитин // *Вестн. Волгоград. гос. мед. ун-та.* – 2017. – № 2(62). – С. 35-38.

83. Разработка методики количественного определения нового производного хинозалинона 2-бензоиламино-п-[4-(4,6-диметилпиримидин-2-илсульфамойл)-фенил]-бензамида методом неводного титрования / Б.В. Боровский, Н.О. Коваль, В.А. Компанцев, И.П. Кодониди // *Вопр. биологич., мед. и фармац. химии.* – 2020. – Т. 23, № 4. – С. 42-49.

84. Разработка методики определения родственной примеси в новом биологически активном соединении кардиопротекторного действия методом капиллярного электрофореза / Е.В. Компанцева, Д.Н. Луценко, Е.Р. Гарсия [и др.] // *Человек и его здоровье.* – 2023. – Т. 26, № 2. – С. 73-79.

85. Разработка хроматографической методики анализа и стандартизации нового производного хинозалинонов – 2-бензоиламино-N-[4-(4,6-диметилпиримидин-2-илсульфамойл)фенил]бензамида / Б.В. Боровский [и др.] // *Хим.-фармац. журн.* – 2020. – Т. 54, № 3. – С. 56-60.

86. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / Под ред. Н.В. Юргеля [и др.]. – М.: Фармац. пром-сть, 2007. – 48 с.

87. Сафиева, Р.З. ИК-спектроскопия в анализе нефти и нефтепродуктов / Р.З. Сафиева, В.Н. Кошелев, Л.В. Иванова // *Вестник Башкир. ун-та.* – 2008. – Т. 13, № 4. – С. 869-874.

88. Сливкин, А.И. Функциональный анализ органических лекарственных веществ: учебное пособие / А.И. Сливкин, Н.П. Садчикова. – Воронеж: Воронеж. гос. ун-т, 2007. – 426 с.

89. Спасов, А.А. Структура и биологическая роль NHE1. Фармакологическая регуляция ЕГО активности / А.А. Спасов, Н.А. Гурова, М.В. Харитоновна // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2013. – Т. 76, № 1. – С. 43-48.

90. Способы идентификации новой биологически активной субстанции, обладающей ноотропной и противогипоксической активностью / Д.С. Волокитина, Д.С. Лазарян, С.В. Волокитин, О.М. Маркова // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции. – Ижевск: Принт-2, 2016. – С. 142-145.

91. Станкевичус, А.П. Циклические N-карбоксамидины. II. Производные морфолинаипиперазина / А.П. Станкевичус, А.А. Лубас, А.Н. Кост // Хим.-фармац. журн. – 1971. – № 1. – С. 13-16.

92. Тимофеева, А.С. Фармакологические свойства производных циклических гуанидинов-ингибиторов  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмена: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.03.06 / А.С. Тимофеева. – Волгоград, 2015. – 22 с.

93. Титриметрические методы в фармацевтическом анализе: учебное пособие [Электронный ресурс] / Г.К. Зиятдинова, Р.М. Варламова, Э.П. Медянцева. – Казань: Казан. ун-т, 2018. – 98 с.

94. Тишков, Т.М. Разработка методики количественного определения соединения VMU-2012-05 (1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила) в таблетках / Т.М. Тишков, А.В. Погребняк, А.А. Озеров // Кубан. науч. мед. вест. – 2018. – № 1. – С. 123-128.

95. ФС «Хлоргексидина диклюконат, спрей для наружного применения спиртовой. Хлоргексидин, спрей для наружного применения спиртовой» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [https://static-1.rosminzdrav.ru/system/attachments/attaches/000/047/742/original/ФС\\_Хлоргексидина\\_диглюконат\\_\\_спрей\\_для\\_наружного\\_применения\\_спиртовой\\_30.09.2019.docx?1570095655](https://static-1.rosminzdrav.ru/system/attachments/attaches/000/047/742/original/ФС_Хлоргексидина_диглюконат__спрей_для_наружного_применения_спиртовой_30.09.2019.docx?1570095655) (дата обращения: 06.06.2022).

96. Цапко, Л.П. Перспективы метаболической терапии при патологии сердца / Л.П. Цапко, С.А. Афанасьев, И.В. Максимов // Сиб. мед. журн. – 2016. –

Т. 31, № 4. – С. 7-12.

97. Чмиленко, Т.С. Новый подход к спектрофотометрическому определению хлорида полигексаметиленгуанидиния / Т.С. Чмиленко, Е.А. Галимбиевская, Ф.А. Чмиленко // Журн. аналит. химии. – 2011. – Т. 66, № 6. – С. 618-624.

98. Чмиленко, Т.С. Образование бромфеноловым красным ионных ассоциатов и их взаимодействие с полигексаметиленгуанидином в водных растворах / Т.С. Чмиленко, Е.А. Галимбиевская, Ф.А. Чмиленко // Методы и объекты хим. анализа. – 2010. – Т. 5, № 1. – С. 19-29.

99. Шилов, А.М. Кардиопротекция в работе врача общей практики: важно или некогда? / А.М. Шилов, А.С. Скотников, А.А. Газданова // Леч. врач. – 2015. – № 8. – С. 76.

100. Экономический ущерб сердечно-сосудистых заболеваний в Российской Федерации в 2016 году / А.В. Концевая [и др.] // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2018. – Т. 14, № 2. – С. 156-166.

101. Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields / P.J. Stephens, F.J. Devlin, C.F. Chabalowski, M.J. Frisch // J. Phys. – 1994. – Vol. 98, № 45. – P. 11623–11627.

102. Bing, R.G., Vitale A. Metabolic studies on the human heart in vivo. I. Studies on carbohydrate metabolism of the human heart / R.G. Bing, A. Siegel, A. Vitale // Am. J. Med. – 1953. – Vol. 15. – P. 284–296.

103. Cardioprotection by Conditioning Mimetic Drugs / E. Santillo [et al.] // Antiinflamm Antiallergy Agents Med. Chem. – 2016. – Vol. 15, № 1. – P. 15–30.

104. ChemAxon – Software Solutions and Services for Chemistry and Biology [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://chemicalize.com> (дата обращения: 06.06.2022).

105. Daksh, S. Validation of analytical methods- Strategies & Singficance / S. Daksh, A. Goyal, Pandiya C.K. // Int.J. Res. Dev. Pharm. L. Sci. – 2015. – Vol. 4(3). – P. 489–1497.

106. De Sutter, J. Cardioprotectedrugs / J. De Sutter, M. Mendes, O. Franco //

The ESC Textbook of Preventive Cardiology. – Oxford: Oxford University Press, 2015.  
– P. 1–52.

107. Determination of chlorhexidine digluconate and polyhexamethylenebiguanide in eye drops by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection / E.M. Abad-Villar, S.F. Etter, M.A. Thiel, P.C. Hauser // *Anal. Chim. Acta.* – 2006. – Vol. 561(1-2). – P. 133–137.

108. Downey, J. M. Why do we still not have cardioprotective drugs? / J.M. Downey, M.V. Cohen // *Circulation J.* – 2009. – Vol. 73, № 7. – P. 1171–1177.

109. Fliegel, L. Molecular biology of the myocardial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger / L. Fliegel // *J. of Molecular and Cellular Cardiology.* – 2008. – № 44. – P. 228–237.

110. Gund, P. Guanidine, trimethylenemethane, and "Y-delocalization." Can acyclic compounds have "aromatic" stability? / P. Gund // *J. Chem. Educ.* – 1972. – Vol. 49. – P. 100–103.

111. Inhibition of delta-protein kinase C by delcasertib as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute anterior ST-segment elevation myocardial infarction: results of the PROTECTION AMI Randomized Controlled Trial / A.M. Lincoff [et al.] // *Eur. HeartJ.* – 2014. – Vol. 35, № 37. – P. 2516–2523.

112. Intracellular Na<sup>+</sup> and altered Na<sup>+</sup> transport mechanisms in cardiac hypertrophy and failure / F. Verdonck, P.G. A. Volders, M.A. Vos, K.R. Sipido // *J. of Molecular and Cellular Cardiology.* – 2003. – Vol. 35, № 1. – P. 5–25.

113. Lucas, A. D., Gordon, E. A., & Stratmeyer, M. E. (2009). Analysis of polyhexamethylenebiguanide in multipurpose contact lens solutions / A.D. Lucas, E.A. Gordon, M.E. Stratmeyer // *TaLanta.* – 2009. – Vol. 80, № 2. – P. 1016–1019.

114. Metabolic modulator perhexiline corrects energy deficiency and improves exercise capacity in symptomatic hypertrophic cardiomyopathy / K. Abozguia [et al.] // *Circulation.* – 2010. – Vol. 122, № 16. – P. 1562–1569.

115. Orłowski, J. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers / J. Orłowski, S. Grinstein // *Compr. Physiol.* – 2011. – Vol. 1, № 4. – P. 2083–2100.

116. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischemic conditions / W.C. Stanley, G.D. Lopaschuk, J.L. Hall, J.G. McCormack //

Cardiovasc. Res. – 1997. – Vol. 33. – P. 243–257.

117. Teppen, B.J. HyperChem, release 2: molecular modeling for the personal computer / B.J. Teppen // J. Chem. Inf. Comput. Sci. – 1992. – Vol. 32. – P. 757–759.

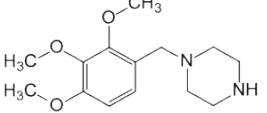
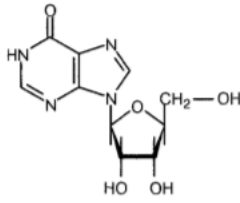
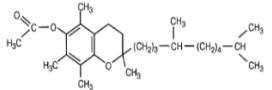
118. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ich.org>.

119. US Pharmacopoeia (USP) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.usp.org> (дата обращения: 06.06.2022).

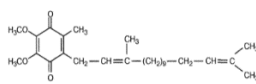
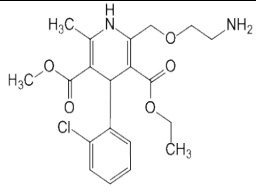
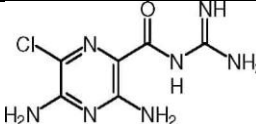
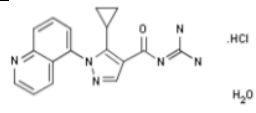
120. Zhang, R. Benzimidazol-2-yl or benzimidazol-2-ylthiomethyl benzoylguanidines as novel Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger inhibitors, synthesis and protection against ischemic-reperfusion injury / R. Zhang, L. Lei, Y. Xu // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2007. – Vol. 17, № 9. – P. 2430-2433.

## Приложение А

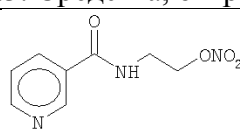
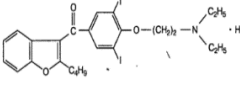
Таблица А.1 – Лекарственные средства кардиопротекторного действия

| Наименование   | Структурная формула   | Описание  | Фармакологическая группа       | Фармакологическое действие   |
|--|---|---|--------------------------------|--|
| <b>1. Регуляторы обмена веществ в миокарде</b>                                   |   |   |                                |  |
| <b>1.1. Препараты с преимущественным воздействием на энергетические процессы</b> |   |   |                                |  |
| Триметазидин<br>(Trimethazidinum)  |  <p>1-[(2,3,4-Триметоксифенилметил)пиперазин (в виде дигидрохлорида)</p> | Таблетки, покрытые пленочной оболочкой розового цвета, круглые, двояковыпуклые; на поперечном разрезе – белого или почти белого цвета                             | Антигипоксанты и антиоксиданты | Антигипоксическое, регулирующее энергетический метаболизм                                    |
| <b>1.2. Анаболические средства стероидной и нестероидной структуры</b>           |   |   |                                |  |
| Рибоксин<br>(Riboxinum)  |  <p>1,9-Дигидро-9-бета-D-рибофуранозил-6Н-пурин-6-он</p>                | Прозрачная бесцветная или слегка желтоватая жидкость  | Метаболическое средство        | Антиаритмическое, антигипоксическое, метаболическое  |
| <b>1.3. Антиоксидантные средства</b>   |   |   |                                |  |
| Альфа-Токоферола ацетат (Alfa-Tocopherol acetate)                                |  <p>6-Ацетокси-2-метил-2-(4,8,12-триметилтридецил)-хроман</p>          | Капсулы мягкие желатиновые, сферической формы, красного цвета, заполненные маслянистой жидкостью от светло-желтого до темно-желтого цвета, без прогорклого запаха | Витаминный препарат            | Антиоксидантное, участвует в биосинтезе гема и белков, пролиферации клеток, тканевом дыхании |

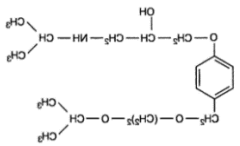
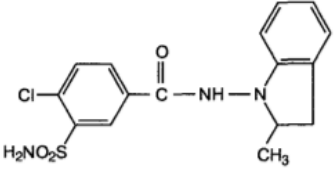
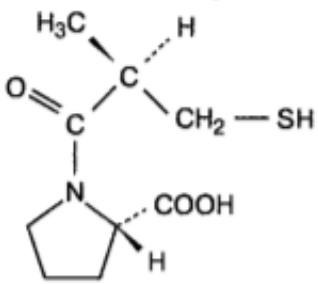
## Продолжение Таблицы А.1

| 1.4. Электроноакцепторы  |  |   |                                 |   |
|--|--|---|---------------------------------|---|
| Убихинон<br>Композитум<br>(Ubichinon<br>Compositum)              |  <p>2,3-диметокси-5-метил-1,4-бензохинон с изопреновой цепью в 6-м положении</p>  | Раствор для в/м введения бесцветный, прозрачный, без запаха                       | <u>Гомеопатическое средство</u> | Антиоксидантное, антигипоксическое  |
| 2. Препараты, влияющие на электролитный баланс в сердечной мышце |  |   |                                 |   |
| 2.1. Селективные блокаторы медленных кальциевых каналов          |  |   |                                 |   |
| Амлодипин<br>(Amlodipinum)                                       |  <p>2-[(2-Аминоэтоксиметил)-4-(2-хлорфенил)-1,4-дигидро-6-метил-3,5-пиридиндикарбоновой кислоты 3-этил 5-метилэтиловый эфир (в виде безилата и малеата)</p> | Белый кристаллический порошок, малорастворим в воде, умеренно растворим в этаноле | Блокаторы кальциевых каналов    | Антиангинальное, гипотензивное, расширяет главные коронарные артерии                                      |
| 2.2. Ингибиторы Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> обмена           |  |   |                                 |   |
| Амилорид<br>(Amiloridum)   |  <p>3,5-Диамино-N-(аминоиминометил)-6-хлорпирозинкарбоксамид (в виде гидрохлорида)</p>  | Таблетки, покрытые пленочной оболочкой от белого до почти белого цвета            | Калийсберегающий диуретик       | Повышает выведение ионов натрия и хлора и уменьшает выведение ионов калия. Оказывает диуретический эффект |
| Зонипорид<br>(Zoniporidum)                                       |  <p>[1-(хинолин-5-ил)-5-циклопропил-1H-пиразол-4-карбонил] гуанидина гидрохлорид моногидрат</p>   |   | Селективный ингибитор NHE-1     | Кардиопротекторным, снижает частоту и продолжительность желудочковых фибрилляций                          |

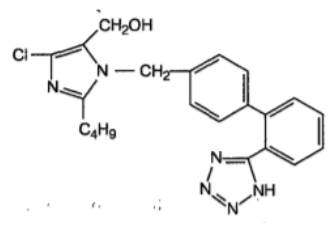
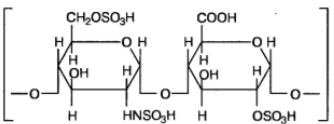
## Продолжение Таблицы А.1

| 2.3. Средства, открывающие АТФ-зависимые К-каналы         |   |   |                                     |   |
|---|---|---|-------------------------------------|---|
| Никорандил<br>(Nicorandilum)                              |  <p>I</p> <p>2-(Пиридин-3-карбониламино)этил нитрат</p>  | Таблетки белого со слабым серовато-желтоватым оттенком цвета, круглые, плоскоцилиндрические                                 | Другие сердечно-сосудистые средства | Антиангинальное средство, обладает нитратоподобными свойствами и способностью открывать калиевые каналы. Снижении пред- и постнагрузки на сердце  |
| 3. Препараты, стабилизирующие мембрану клеток миокарда    |   |   |                                     |   |
| 3.1. Противоаритмические средства                         |   |   |                                     |   |
| Амиодарон<br>(Amiodaronum)                                |  <p>(2-Бутил-3-бензофуранил)-[4-(2-диэтиламино)этоксидифенил]метанон (в виде гидрохлорида)</p>                 | Кристаллический порошок белого или кремового цвета. Малорастворим в воде, растворим в спирте, хорошо растворим в хлороформе | Антиаритмические средства           | Антиангинальное, антиаритмическое   |
| 4. Средства, уменьшающие потребность миокарда в кислороде |   |   |                                     |   |
| 4.1. Органические нитраты                                 |   |   |                                     |   |
| Нитронг (Nitrong)   | $\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{O} - \text{NO}_2 \\   \\ \text{CH} - \text{O} - \text{NO}_2 \\   \\ \text{CH}_2 - \text{O} - \text{NO}_2 \end{array}$ <p>1,2,3-Пропантриола тринитрат</p> | Микрокапсулированная лекарственная форма нитроглицерина в виде таблеток   | Нитраты и нитратоподобные средства  | Расширяет периферические сосуды, преимущественно венозные, уменьшает пред- и постнагрузку на сердце, потребность миокарда в кислороде, за счет расширения коронарных сосудов улучшает кровоснабжение миокарда |

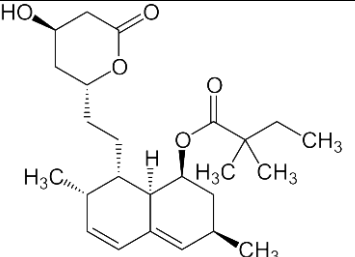
## Продолжение Таблицы А.1

| 4.2. Бета-Адреноблокаторы                                    |  |   |                      |  |
|--|--|---|----------------------|--|
| Бисопролол<br>(Bisoprololum)                                 |  <p>1-[4-[[2-(1-Метилэтокс)этокс]метил]фенокс]3-[(1-метилэтил)амино]-2-пропанол (и в виде fumarata)</p> | Таблетки круглые, с двояковыпуклой поверхностью, покрытые оболочкой белого или почти белого цвета | Бета-адреноблокаторы | Антигипертензивное, антиаритмическое, антиангинальное действие         |
| <b>Кардиопротекторы прямого действия</b>                     |  |   |                      |  |
| <b>Кардиопротекторы непрямого действия</b>                   |  |   |                      |  |
| 1. Антигипертензивные средства различного механизма действия |  |   |                      |  |
| 1.1. Диуретики   |  |   |                      |  |
| Индапамид<br>(Indapamidum)                                   |  <p>3-(Аминосульфонил)-4-хлор-N-(2,3-дигидро-2-метил-1H-индол-1-ил)бензамид (в виде полугидрата)</p>    | Белый или желтовато-белый кристаллический порошок, растворимый в водных растворах сильных щелочей | Диуретики            | Диуретическое, гипотензивное, вазодилатирующее                         |
| 1.2. Ингибиторы АПФ  |  |   |                      |  |
| Каптоприл<br>(Captoprilum)                                   |  <p>(S)-1-(3-Меркапто-2-метил-1-оксопропил)-L-пролин</p>  | Белый или не совсем белый кристаллический порошок со слабым запахом серы                          | Ингибиторы АПФ       | Гипотензивное, вазодилатирующее, натрийуретическое, кардиопротективное |

## Продолжение Таблицы А.1

| 1.3. Блокаторы рецепторов анготензина II              |   |  |  |  |
|---|---|--|--|--|
| Лозартан<br>(Losartanum)                              |  <p>2-Бутил-4-хлор-1-[[2'-(1Н-тетразол-5-ил)[1,1'-бифенил]-4-ил]-метил]-1Н-имидазол-5-метанол (в виде калиевой соли)</p> | Кристаллический порошок белого или почти белого цвета, который хорошо растворим в воде и этиловом спирте, плохо растворим в органических растворителях | Антагонисты рецепторов ангиотензина II | Антигипертензивное, устраняет сосудосуживающее действие ангиотензина II, его стимулирующее влияние на секрецию альдостерона надпочечниками |
| 2. Средства, влияющие на реологические свойства крови |   |  |  |  |
| 2.1. Ингибирующие агрегацию тромбоцитов               |   |  |  |  |
| Тиклопидин<br>(Ticlopidinum)                          |  <p>5-[2-Хлорфенил)метил]-4,5,6,7-тетрагидротиено[3,2-с]пириндин (и в виде гидрохлорида)</p>                           | Белый твердый кристаллический порошок. Легко растворим в воде, метаноле, умеренно растворим в этаноле, трудно растворим в ацетоне                      | Антиагреганты                          | Антиагрегационное, антитромботическое  |
| 2.2. Антикоагулянты                                   |   |  |  |  |
| Гепарин<br>(Heparinum)                                |  <p>Мукополисахарид эфира полисерной кислоты</p>   | Аморфный порошок от белого до серовато-коричневого цвета, без запаха, гигроскопичен  | Антикоагулянты                         | Антитромбическое, уменьшение сосудистой проницаемости  |

## Продолжение Таблицы А.1

| 3. Лекарственные средства, влияющие на липидный обмен |   |   |         |   |
|---|---|---|---------|---|
| 3.1. Гиполипидемические средства                      |   |   |         |   |
| Симвастатин<br>(Simvastatinum)                        |  <p>1,2,3,7,8,8а-Гексагидро-3,7-диметил-8-[2-(тетрагидро-4-гидрокси-6-оксо-2Н-пиран- 2-ил)этил]-1-нафталенил-2,2-диметилбутаноат</p> | Белый или почти белый кристаллический порошок. Неигроскопичен | Статины | Гипохолестеринемическое. Снижает концентрацию ЛПНП и ЛПОНП. Повышает содержание ЛПВП и снижает концентрацию триглицеридов |

## Приложение Б

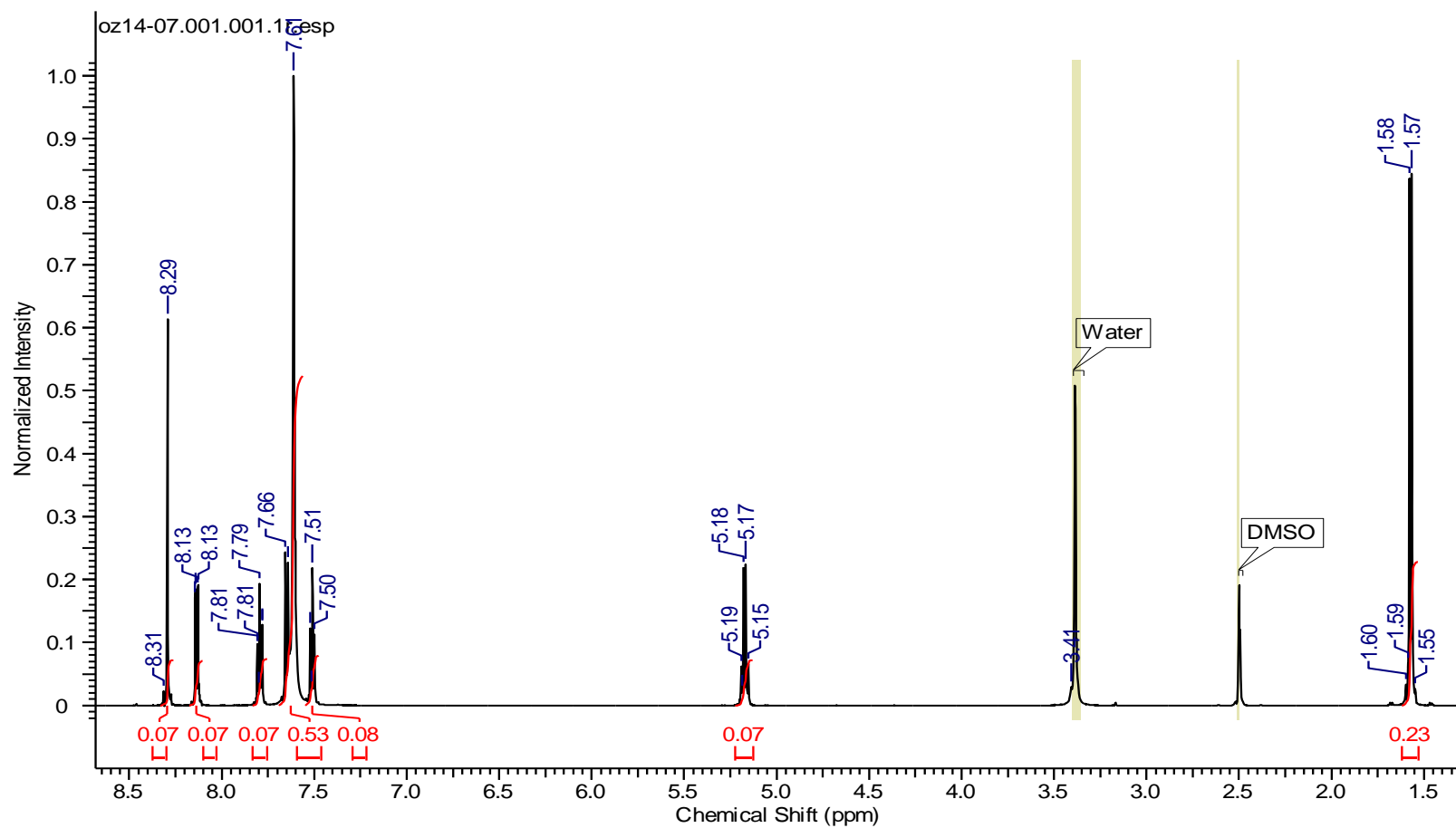


Рисунок Б.1 – ЯМР-спектр условного стандартного образца N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

## Приложение В

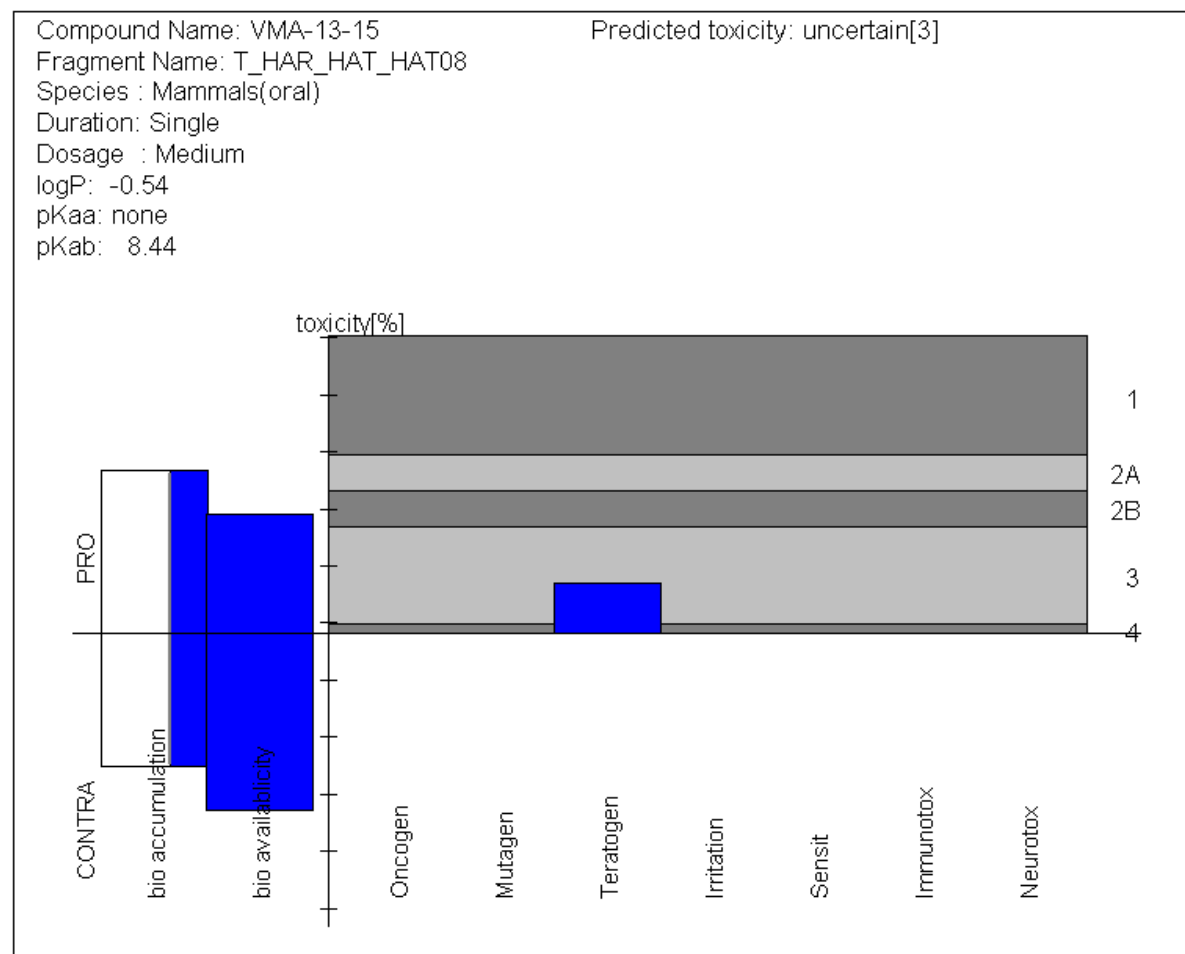


Рисунок В.1 – Определение токсичности N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидина

## Приложение Г

Таблица Г.1 – Оптические характеристики УФ-спектров поглощения


| Длина волны 226 нм |        |       |                 | Длина волны 266 нм |        |       |                 | Длина волны 302 нм |        |       |                 | Водный р-р |
|--------------------|--------|-------|-----------------|--------------------|--------|-------|-----------------|--------------------|--------|-------|-----------------|------------|
| Взято мл (Р-р Б)   | С,%    | А     | $A_{1cm}^{1\%}$ | Взято мл (Р-р А)   | С,%    | А     | $A_{1cm}^{1\%}$ | Взято мл (Р-р А)   | С,%    | А     | $A_{1cm}^{1\%}$ |            |
| 2,0                | 0,0002 | 0,223 | 1115            | 1,0                | 0,001  | 0,214 | 214             | 3,0                | 0,003  | 0,338 | 113             | Водный р-р |
| 3,0                | 0,0003 | 0,312 | 1040            | 1,5                | 0,0015 | 0,325 | 217             | 3,5                | 0,0035 | 0,399 | 114             |            |
| 4,0                | 0,0004 | 0,415 | 1038            | 2,0                | 0,002  | 0,423 | 211             | 4,0                | 0,004  | 0,456 | 115             |            |
| 5,0                | 0,0005 | 0,520 | 1040            | 2,5                | 0,0025 | 0,535 | 214             | 4,5                | 0,0045 | 0,485 | 116             |            |
| 6,0                | 0,0006 | 0,618 | 1030            | 3,0                | 0,003  | 0,663 | 221             | 5,0                | 0,005  | 0,583 | 117             |            |
| 7,0                | 0,0007 | 0,729 | 1041            | 3,5                | 0,0035 | 0,779 | 223             | 5,5                | 0,0055 | 0,651 | 118             |            |
| 8,0                | 0,0008 | 1,837 | 1046            | 4,0                | 0,004  | 1,896 | 224             | 6,0                | 0,006  | 0,710 | 119             |            |
| 1,0                | 0,0001 | 0,172 | 1720            | 1,0                | 0,001  | 0,268 | 268             | 2,0                | 0,002  | 0,227 | 114             |            |
| 2,0                | 0,0002 | 0,355 | 1775            | 1,5                | 0,0015 | 0,419 | 279             | 3,0                | 0,003  | 0,365 | 121             |            |
| 3,0                | 0,0003 | 0,536 | 1786            | 2,0                | 0,002  | 0,501 | 251             | 4,0                | 0,004  | 0,493 | 123             |            |
| 4,0                | 0,0004 | 0,682 | 1705            | 2,5                | 0,0025 | 0,634 | 254             | 5,0                | 0,005  | 0,627 | 126             |            |
| 5,0                | 0,0005 | 0,859 | 1718            | 3,0                | 0,003  | 0,759 | 253             | 6,0                | 0,006  | 0,761 | 127             |            |
| 6,0                | 0,0006 | 0,992 | 1653            | 3,5                | 0,0035 | 0,886 | 253             | 7,0                | 0,007  | 0,889 | 127             |            |
| 7,0                | 0,0007 | 1,244 | 1778            | 4,0                | 0,004  | 1,022 | 255             | 8,0                | 0,008  | 1,033 | 129             |            |
| 3,0                | 0,0003 | 0,295 | 983             | 1,0                | 0,001  | 0,230 | 230             | 3,0                | 0,003  | 0,343 | 114             | Щел        |
| 4,0                | 0,0004 | 0,392 | 980             | 1,5                | 0,0015 | 0,319 | 213             | 3,5                | 0,0035 | 0,404 | 115             |            |
| 5,0                | 0,0005 | 0,502 | 1004            | 2,0                | 0,002  | 0,436 | 218             | 4,0                | 0,004  | 0,475 | 119             |            |

Продолжение Таблицы Г.1

|                           |        |       |      |                           |        |       |     |     |        |       |     |            |
|---------------------------|--------|-------|------|---------------------------|--------|-------|-----|-----|--------|-------|-----|------------|
| 6,0                       | 0,0006 | 0,612 | 1020 | 2,5                       | 0,0025 | 0,544 | 217 | 4,5 | 0,0045 | 0,539 | 120 | Кислый р-р |
| 7,0                       | 0,0007 | 0,730 | 1042 | 3,0                       | 0,003  | 0,667 | 222 | 5,0 | 0,005  | 0,610 | 122 |            |
| 8,0                       | 0,0008 | 0,853 | 1066 | 3,5                       | 0,0035 | 0,782 | 223 | 5,5 | 0,0055 | 0,689 | 125 |            |
| 9,0                       | 0,0009 | 0,971 | 1078 | 4,0                       | 0,004  | 0,897 | 224 | 6,0 | 0,0006 | 0,751 | 126 |            |
| <b>Длина волны 227 нм</b> |        |       |      | <b>Длина волны 273 нм</b> |        |       |     |     |        |       |     |            |
| 3,0                       | 0,0003 | 0,236 | 787  | 1,0                       | 0,001  | 0,204 | 204 | -   | -      | -     | -   |            |
| 4,0                       | 0,0004 | 0,302 | 770  | 1,5                       | 0,0015 | 0,309 | 206 | -   | -      | -     | -   |            |
| 5,0                       | 0,0005 | 0,412 | 824  | 2,0                       | 0,002  | 0,398 | 199 | -   | -      | -     | -   |            |
| 6,0                       | 0,0006 | 0,489 | 815  | 2,5                       | 0,0025 | 0,502 | 201 | -   | -      | -     | -   |            |
| 7,0                       | 0,0007 | 0,586 | 837  | 3,0                       | 0,003  | 0,614 | 205 | -   | -      | -     | -   |            |
| 8,0                       | 0,0008 | 0,675 | 844  | 3,5                       | 0,0035 | 0,731 | 209 | -   | -      | -     | -   |            |
| 9,0                       | 0,0009 | 0,773 | 859  | 4,0                       | 0,004  | 0,852 | 213 | -   | -      | -     | -   |            |

## Приложение Д

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора по научной работе  
Пятигорского медико-фармацевтического  
института – филиала ФГБОУ ВО ВолГМУ  
Минздрава России  
профессор  Д.А. Коновалов

2021 г.



### Акт о внедрении

результатов научных исследований, выполненных на кафедре фармацевтической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России

**Наименование разработки.** Методики анализа субстанции VMA-13-15 N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]-гуанидин методом капиллярного электрофореза для изучения процессов ее деструкции.

**Место разработки.** Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства Здравоохранения Российской Федерации (ПМФИ - филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ МЗ РФ), кафедра фармацевтической химии.

**Авторы.** Луценко Д.Н., аспирант кафедры фармацевтической химии; Компанцева Е.В., профессор кафедры фармацевтической химии, профессор;

**Место внедрения.** Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства Здравоохранения Российской Федерации в учебный процесс на первом и втором курсе в аспирантуре (в рамках занятий) по дисциплине Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

**Форма внедрения.** Результаты исследования использованы при разработке учебно-методического информационного комплекса для аспирантов по дисциплине Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Заведующий кафедрой  
фармацевтической химии

М.В. Ларский

Начальник отдела аспирантуры и  
докторантуры, доцент кафедры  
фармацевтической химии



Е.В. Губанова

## Приложение Е



**Акт о внедрении**  
результатов научных исследований по разработке  
проекта ФС на субстанцию VMA-13-15  
N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]гуанидина

**Наименование разработки.** Проект фармакопейной статьи (ФС) на субстанцию VMA-13-15 N-[2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропионил]гуанидина.

**Предмет внедрения:** Методики контроля качества новой биологически активной субстанции VMA-13-15.

**Место разработки.** Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства Здравоохранения Российской Федерации (ПМФИ - филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ МЗ РФ), кафедра фармацевтической химии.

**Разработчики ФС.** Луценко Д.Н., аспирант кафедры фармацевтической химии ПМФИ; Компанцева Е.В., профессор кафедры фармацевтической химии ПМФИ; Озеров А.А., заведующий кафедрой фармацевтической и токсикологической химии ВолгГМУ, доктор химических наук, профессор.

**Цель внедрения.** Обеспечение надлежащего контроля производства субстанции VMA-13-15; создание нормативной документации на субстанцию VMA-13-15, а именно проекта фармакопейной статьи (ФС).

**Результаты внедрения.** Разработанные методики анализа новой субстанции VMA-13-15, производной хиназолин-4(3H)-она, оформленные в виде проекта нормативной документации (ФС), нашли применение в анализе и используются в аналитической группе отдела синтеза и фармацевтических технологий Научного центра инновационных лекарственных средств ВолгГМУ.

Руководитель отдела синтеза и  
фармацевтических технологий  
НЦИЛС ВолгГМУ, профессор

А. А. Озеров

**Приложение Ж****СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА****ПРОЕКТ НОРМАТИВНОЙ ДОКУМЕНТАЦИИ**

[Заявитель регистрации]

[Владелец]

VMA-13-15

Субстанция

*N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидин

Настоящий проект нормативной документации распространяется на лекарственное средство VMA-13-15, субстанция

**ПРОИЗВОДИТЕЛЬ****ФАСОВЩИК****УПАКОВЩИК****ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА****ЗАЯВИТЕЛЬ (\_\_\_\_\_)**

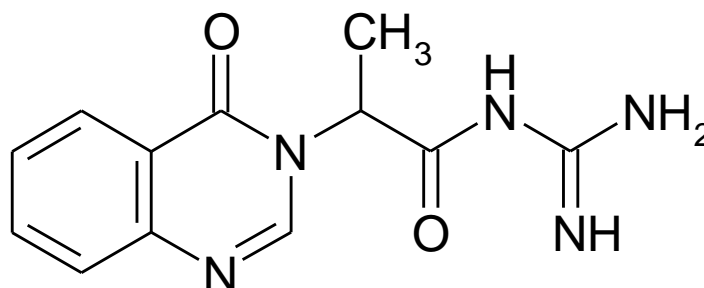
### Спецификация на субстанцию VMA-13-15

| Показатели                           | Методы   | Нормы  |
|--------------------------------------|--|--|
| Описание                             | Визуальный   | Белый аморфный порошок, без запаха   |
| Растворимость                        | ОФС.1.2.1.0005   | Растворим в воде очищенной, мало растворим в спирте этиловом 96%, и практически нерастворим в хлороформе |
| Подлинность                          | ИК-спектроскопия<br>ОФС.1.2.1.1.0002                             | Соответствие спектра субстанции VMA-13-15 и спектра стандартного образца                                 |
|                                      | УФ-спектрофотометрия<br>ОФС.1.2.1.1.0003                         | Должен иметь максимумы поглощения 226±2 нм, 266±2 нм, 302±2 нм   |
|                                      | Качественная реакция   | Появление оранжево-красного окрашивания  |
| Температура плавления                | ОФС.1.2.1.0011   | от 268°C до 270°C  |
| Кислотность или щелочность           | Титриметрия  | Не более 0,15 мл NaOH раствора 0,01 М<br>Не более 0,15 мл HCl раствора 0,01 М                            |
| Родственные примеси                  | ВЭЖХ<br>ОФС.1.2.1.2.0005   | Не более 0,1% незамещенного хиназолин-4(3)-она   |
| Остаточные органические растворители | Газовая хроматография<br>ОФС.1.1.0008                            | Содержание метанола не должно превышать 3000 ppm (0,3%);<br>Содержание диэтилового эфира не более 0,5%.  |
| Сульфатная зола и тяжелые металлы    | ОФС.1.2.2.2.0014   | Сульфатная зола не более 0,1%  |
|                                      | ОФС.1.2.2.2.0012   | Тяжелые металлы-не более 0,001%  |
| Потеря в массе при высушивании       | ОФС.1.2.1.0010.15  | Не более 0,5%  |
| Количественное определение           | Кислотно-основное титрование в неводных средах<br>ОФС.1.2.3.0014 | Не менее 99,0% (в пересчете на сухое вещество)   |
| Хранение                             | В прохладном, защищенном от света месте                          |  |
| Срок годности                        | 2 года   |  |

**Химическое название:**

*N*-[2-[4-оксо-3(4*H*)-хиназолинил]пропионил]-гуанидин

**Структурная формула:**



**Эмпирическая формула:**  $C_{12}H_{13}N_5O_2$

**Молекулярная масса:** М.м. 259,27

Субстанция содержит не менее 99,0% в пересчете на сухое вещество.

**Описание.** Белый аморфный порошок, без запаха.

**Растворимость.** Растворим в воде очищенной, мало растворим в спирте этиловом 96% и практически нерастворим в хлороформе (ГФ РФ XV изд., ОФС.1.2.1.0005).

**Подлинность.**

1. *ИК-спектр.* Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400  $cm^{-1}$  по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца (ГФ РФ XV изд., ОФС.1.2.1.1.0002).

2. *УФ-спектр.* Ультрафиолетовый спектр поглощения 0,001% водного раствора субстанции в области длин волн от 200 до 400 нм должен иметь максимумы поглощения при  $226 \pm 2$  нм,  $266 \pm 2$  нм и  $302 \pm 2$  нм (ГФ РФ XV изд., ОФС.1.2.1.1.0003).

**Методика.** Около 0,0500 (точная навеска) субстанции VMA-13-15 помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляют 30 мл воды очищенной, взбалтывают до полного растворения и доводят этим же растворителем до метки (раствор А). При измерении спектра в области 250-280 нм 2мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят до метки водой очищенной. При измерении оптической плотности в области 220-240 нм 10 мл раствора А 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.

3. *Качественная реакция на гуанидиновый остаток.*

**Методика.** К 2 мл 1%-го раствора субстанции добавляют 2 мл 10%-го раствора едкого натра и несколько капель 0,2% спиртового раствора а-нафтола. Содержимое пробирки хорошо перемешивают, приливают 0,5 мл раствора

гипобромита и перемешивают. Должно появиться оранжево-красное окрашивание.

**Температура плавления.** от 268°C до 270°C (ГФ РФ XV изд., ОФС.1.2.1.0011).

**Кислотность или щелочность. Методика:** 1 г субстанции встряхивают с 20 мл воды, свободной от углерода диоксида, в течение 15 мин, раствор фильтруют. Затем к 10 мл фильтрата прибавляют 0,1 мл раствора метилового красного. При появлении желтой окраски она должна измениться на розовую при добавлении не более 0,15 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,01 М. При появлении розовой окраски она должна измениться на желтую при добавлении не более 0,15 мл натрия гидроксида раствора 0,01 М.

**Родственные примеси.** Испытание проводят методом ВЭЖХ (ГФ РФ XV изд., ОФС.1.1.0023; ОФС.1.2.1.2.0005).

*Испытуемый раствор:* Около 0,0200 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляют 30 мл воды очищенной и перемешивают. Затем доводят до метки этим же растворителем. Получают рабочий раствор субстанции с концентрацией 0,02%.

*Стандартный раствор примеси исходного хиназолин-4(3H)-она:* около 0,02 г (точная навеска) исходного хиназолин-4(3H)-она помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляют 30 мл воды очищенной и перемешивают. Затем доводят до метки этим же растворителем и продолжают растворение. Получают стандартный раствор исходного хиназолин-4(3H)-она.

*Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.*

Испытуемый раствор: около 0,02 г (точная навеска) субстанции и 0,002 г примеси исходного хиназолин-4(3H)-она помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляют 30 мл воды очищенной и перемешивают. Затем доводят до метки этим же растворителем и продолжают растворение.

*Хроматографические условия:*

- подвижная фаза: ацетонитрил-0,5% муравьиная кислота (80:20);
- колонка Nucleosil C18 размером 150 × 4,6 мм с зернением

октадецилсиликагеля равным 5 мкм;

- режим элюирования: изократический;
- скорость потока – 1,0 мл/мин;
- объем вводимой пробы – 20 мкл;
- детектор спектрофотометрический, 254 нм;
- температура колонки –  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ;
- время хроматографирования – 10 минут.

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются условия теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Хроматографируют раствор стандартного образца примеси и испытуемый раствор.

Содержание примеси не должно превышать 0,1%.

**Остаточные органические растворители.** Остаточные органические растворители (согласно ОФС.1.1.0008). Исследования проводят методом газовой хроматографии (согласно ОФС.1.2.1.2.0004).

*Испытуемый раствор:* около 0,5 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляют 5 мл воды очищенной и в течение 15 минут обрабатывают ультразвуком, объем раствора доводят тем же растворителем до метки, перемешивают.

*Стандартный раствор метанола:* около 1 г (точная навеска) стандартного образца метанола помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде очищенной, объем раствора доводят до метки тем же растворителем и перемешивают. Далее 2 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят до метки водой очищенной и перемешивают.

*Стандартный раствор диэтилового эфира:* около 1 г (точная навеска) стандартного образца диэтилового эфира помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде очищенной, объем раствора доводят до метки тем же растворителем и перемешивают. Далее 2 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят до метки водой

очищенной и перемешивают.

Хроматографирование проводят с использованием следующих условий:

- хроматографическая колонка – ZB-FFAP (50 м, 0,32 мм, 0,52 мкм);
- газ-носитель – азот;
- скорость газа-носителя – 0,5-1 мл/мин;
- деление потока 1:10;
- температура инжектора – 250°C, детектора – 220°C; температура колонки (изотерма) – 160°C (выдержано 5,5 мин);
- программирование температуры со скоростью 10°C/мин до 160°C;
- время анализа – 30 мин;
- на поддув детектора расход водорода 25 мл/мин, воздуха 250 мл/мин, азота 40 мл/мин;
- объем вводимой пробы – 1 мкл.

Детектирующее устройство – детектор пламенно-ионизационный (ПИД).

Расчет содержания остаточных растворителей в субстанции проводят по формуле:

$$C\% = \frac{S_x \cdot C_{ст} \cdot 100 \cdot 100}{S_{ст} \cdot a \cdot 1000},$$

где  $C_{ст}$  – количество СО в 1 мл стандартного раствора, мг;

$a$  – навеска БАС, г;

$S_x$  – площади пика исследуемого вещества;

$S_{ст}$  – площадь пика стандартного образца.

Содержание метанола не должно превышать 3000 ppm (0,3%), содержание диэтилового эфира не более 0,5%.

**Сульфатная зола.** Не более 0,1% (ГФ РФ XV изд., ОФС.1.2.2.2.0014). Для определения используют около 1 г (точная навеска) субстанции.

**Тяжелые металлы.** Не более 0,001%. (ГФ РФ XV изд., ОФС.1.2.2.2.0012). Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжелые металлы» в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола»).

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 0,5% (ГФ РФ XV изд.,

ОФС.1.2.1.0010, способ 1). Для определения используют около 0,5000 г (точная навеска) субстанции.

**Количественное определение.**

1. *Метод кислотно-основного титрования в неводных растворителях (ГФ РФ XV изд., ОФС.1.2.3.0014).*

Около 0,1000 г (точная навеска) субстанции вносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 20 мл уксусной кислоты ледяной, раствор перемешивают. Титрование проводят хлорной кислоты раствором 0,1 М, добавляют титрант порциями по 0,1 мл. При приближении к точке эквивалентности титрант добавляют порциями по 0,01 мл. Параллельно проводят контрольный опыт.

Конечную точку титрования определяют потенциометрически.

1 мл хлорной кислоты раствор 0,1 М соответствует 12,964 мг  $C_{12}H_{13}N_5O_2$ .

Содержание субстанции VMA-13-15 должно составлять не менее 99,0%.

**Упаковка.**

**Маркировка.**

**Хранение.** В защищенном от света месте, при температуре не выше 25°C.

**Срок годности.** 2 года.