



Статья поступила в редакцию 09.12.2013,
доработана автором 20.02.2014

УДК 543.4:544.2

ВАЛИДАЦИЯ АНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ ДЛЯ СТАНДАРТИЗАЦИИ СУБСТАНЦИИ 5,7-БИС-(МЕТА- НИТРОФЕНИЛАМИНО)-4,6-ДИНИТРОБЕНЗОФУРОКСАНА

Целью исследования являлась разработка и валидация методики количественного определения остаточных органических растворителей в субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофуроксана с применением метода газовой хроматографии. Проведенная валидация разработанной нами методики количественного определения остаточных органических растворителей – этилового спирта и ацетонитрила в субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофуроксана с использованием метода газовой хроматографии позволила оценить ее метрологические характеристики. Исходя из валидационных испытаний, валидационные характеристики соответствуют принятым критериям. Специфичность методики демонстрируется полным хроматографическим разделением пиков этанола и ацетонитрила, а также отсутствием пика этанола и ацетонитрила на хроматограмме растворителя. Линейность методики доказана в диапазоне от предела их количественного определения до 120 % от заявленных концентраций соответственно. Прецизионность методики соответствует допустимым нормам – относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности при определении этанола и ацетонитрила менее 4 %. Результаты валидационных испытаний методики доказывают пригодность аналитической методики количественного определения остаточных органических растворителей в субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофуроксана методом газовой хроматографии.

Ключевые слова: 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофуроксан, валидация, стандартизация.

Среди производных бензофуроксанов синтезирована малотоксичная субстанция 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофуроксана, обладающая выраженными антигельминтными свойствами [1]. Для стандартизации субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофуроксана первоначально необходимо исследовать ее физические и физико-химические свойства, разработать точные и надежные методики анализа. Согласно ОСТ 42-506–96 в случае использования токсичных растворителей при изготовлении лекарственных средств обязателен контроль остаточных количеств растворителей [2]. Для очистки субстанции

Мархабуллина Р. Ш.

Аспирант кафедры химии
и технологии органических
соединений азота (ХТОСА)
Казанского национального
исследовательского
технологического
университета (КНИТУ)

Юсупова Л. М.

Д-р хим. наук,
проф. кафедры ХТОСА КНИТУ
Россия, 420015,
г. Казань, ул. К. Маркса, 68
E-mail: remarkh@bk.ru



от посторонних примесей используются органические растворители второго и третьего класса токсичности (ацетонитрил и этиловый спирт 96 %). Для количественного определения этанола 96 % и ацетонитрила в субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана использован метод газовой хроматографии, характеризующийся универсальностью и высокой чувствительностью [3]. Для подтверждения достоверности и воспроизводимости разработанной методики необходимо провести ее валидацию. Валидация аналитических методик доказывает обоснованность выбора метода и условий проведения анализа, увеличивает степень гарантии качества лекарственных средств [4].

Исходя из актуальности темы целью исследования является проведение валидации аналитической методики количественного определения остаточных органических растворителей в субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана по показателям: специфичность, правильность, линейность, предел количественного определения, сходимость, промежуточная прецизионность, стабильность, а также определить возможность использования метода газовой хроматографии для количественного определения остаточных органических растворителей в субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана.

Для разработки и валидации методики количественного определения остаточных органических растворителей в субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана использовали мерную посуду класса А, аналитические весы марки AUW 120 D фирмы Shimadzu и газовый хроматограф "Clarus 500" марки PerkinElmer с кварцевой капиллярной колонкой длиной 3000 см, диаметром 0,32 мм, типа Elit-5, позволяющей получить степень разделения не менее 1,5 для пиков определяемых веществ. В работе использовались очищенная субстанция 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана, этиловый спирт 96 %, ацетонитрил и диметилсульфоксид (для хроматографии).

Очистка субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана от примесей (мета-нитроанилин и 5,7-дихлоро-4,6-динитробензофураксан) проводилась методом перекристаллизации в бинарной системе растворителей: этиловый спирт 96 % – ацетонитрил. Для максимального удаления ацетонитрила и этилового спирта 96 % перекристаллизованную субстанцию промывали сначала этиловым спиртом 96 % (для удаления ацетонитрила), а затем большим количеством очищенной воды. Высушенную до постоянной массы субстанцию далее анализировали на содержание актив-

ного вещества и остаточных органических растворителей. После перекристаллизации содержание активного вещества было определено потенциометрически и составило 99,99 %. Определение органических растворителей проводили методом газовой хроматографии с использованием хроматографа с пламенно-ионизационным детектором.

Количество органических растворителей в субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана рассчитывали методом внешнего стандарта. Для приготовления раствора стандартного образца около 0,5 г (точная навеска) этилового спирта 96 % (для хроматографии) и около 0,041 г ацетонитрила (с точностью до 0,0001 г) (для хроматографии), помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 80 мл диметилсульфоксида (для хроматографии), доводили диметилсульфоксидом до метки и перемешивали. Полученный раствор фильтровали через фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм. Для приготовления испытуемого раствора около 0,1 г (с точностью до 0,0001 г) субстанции помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяли в 5 мл диметилсульфоксида (для хроматографии), доводили тем же растворителем до метки и перемешивали. Полученный раствор фильтровали через фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм. Испытуемый раствор и раствор стандартного образца хроматографировали не менее трех раз. В результате исследований выбраны следующие условия: газовый хроматограф с пламенно-ионизационным детектором; кварцевая капиллярная колонка длиной 3000 см, диаметром 0,32 мм, типа Elit-5, или аналогичная, позволяющая получить степень разделения не менее 1,5 для пиков определяемых веществ; температурный режим: температура термостата колонки 50 °C в течение 2 мин, далее подъем температуры до 150 °C со скоростью 10 °C/мин и выдерживание при этой температуре в течение 15 мин; температура испарителя – 230 °C; температура детектора – 250 °C; скорость газа-носителя (гелий) – 1 мл/мин; расход водорода – 45 мл/мин; расход воздуха – 450 мл/мин; деление потока – 50/1; время анализа – 27 мин.

В испаритель хроматографа вводили по 0,1 мкл испытуемого раствора и раствора стандартного образца. Получали не менее трех хроматограмм для каждого раствора.

Время удерживания пика этанола 96 % – около 3,91 мин, пика ацетонитрила – около 4,21 мин.

Содержание этилового спирта 96 % и ацетонитрила в препарате в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot 10 \cdot 100}{S_0 \cdot a_1 \cdot 100 \cdot 100} = \frac{S_1 \cdot a_0}{S_0 \cdot a_1 \cdot 10},$$



где S_0 – среднее значение площади пика соответствующего растворителя, вычисленное по трем хроматограммам раствора стандартного образца;

S_1 – среднее значение площади пика соответствующего растворителя, вычисленное по трем хроматограммам испытуемого раствора;

a_1 – навеска субстанции, г;

a_0 – навеска этилового спирта 96 % (ацетонитрила), взятая для приготовления стандартного раствора, г.

Содержание этилового спирта 96 % и ацетонитрила в субстанции должно быть не более 0,5 % и не более 0,041 % соответственно.

Результаты анализов показали, что в субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофуросана присутствуют растворители второго (ацетонитрил) и третьего (этиловый спирт 96 %) класса токсичности в количествах, не превышающих регламентируемые нормы [5].

Для гарантии воспроизводимости разработанной методики была проведена ее валидация по следующим параметрам:

- специфичность;
- правильность;
- линейность;
- предел количественного определения;
- сходимость;
- промежуточная прецизионность;
- стабильность.

Специфичность методики проводилась для определения влияния подвижной фазы на пики примесей (этилового спирта 96 % и ацетонитрила) [6, 7, 8].

Согласно рис. 1 время удерживания пика диметилсульфоксида составило около 10,4 мин.

На рис. 2 представлена хроматограмма раствора стандартного образца. Время удерживания пика этилового спирта 96 % составило 3,92 мин, а ацетонитрила – 4,22 мин.

При тестировании методики определения остаточных органических растворителей в субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофуросана по параметру «Специфичность» на хроматограмме подвижной фазы наблюдается отсутствие пиков, принадлежащих этиловому спирту 96 % и ацетонитрилу.

Для определения правильности были приготовлены три модельных раствора с содержанием этилового спирта 96 % и ацетонитрила в диапазоне концентраций 80, 100, 120 % от заданного предельного содержания соответствующего органического растворителя. Каждый раствор хроматографировали не менее трех раз. Относительное стандартное отклонение для количественного

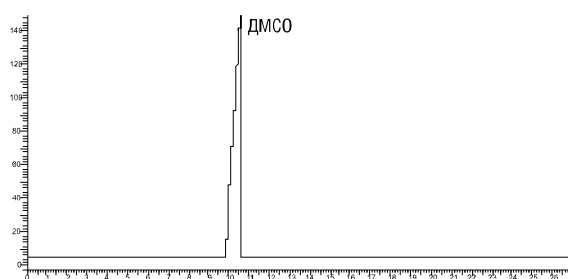


Рис. 1. Хроматограмма подвижной фазы (диметилсульфоксид)

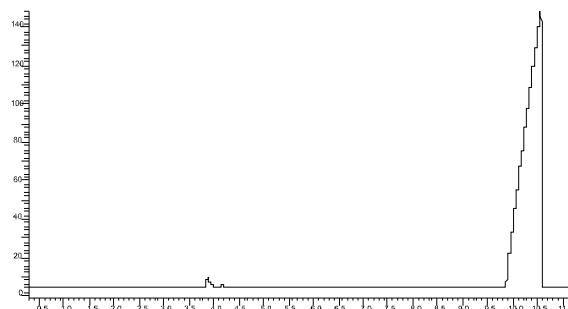


Рис. 2. Хроматограмма раствора стандартного образца (общий вид)

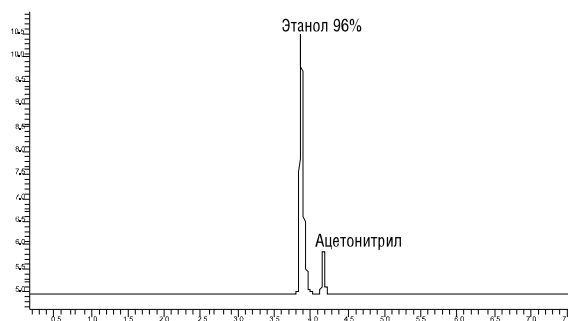


Рис. 3. Хроматограмма раствора стандартного образца (увеличенный вид)

определения этилового спирта 96 % и ацетонитрила должно быть не более 4 % [9].

Согласно табл. 1 значение относительного стандартного отклонения для количественного определения этилового спирта 96 % составило 1,56 %.

Согласно табл. 2 значение относительного стандартного отклонения для ацетонитрила составило 1,90 %.

Для определения линейности методики приготовлены пять проб с концентрациями ацетонитрила и этанола 96 % от предела их количественного определения до 120 % от заявленных концентраций (5 мг/мл для этанола 96 % и 0,41 мг/мл для ацетонитрила).



Таблица 1

Количественное определение этанола 96 % в модельных растворах

№	Заложено, г	Измерено		Метрологические характеристики
		г	%	
1	0,4	0,406	101,50	Число определений $n = 9$, $f = n - 1 = 8$ Среднее значение $\bar{X} = 100,30$ % Дисперсия $S^2 = 2,42$ Среднее квадратичное отклонение $S = 1,56$ % Коэффициент Стьюдента t (95 %, f) = 2,31 Относительное стандартное отклонение $S_{\bar{X}} = 1,56$ % Доверительный интервал $\Delta\bar{X} = 1,20$ % Относительная погрешность $\bar{\varepsilon} = 1,20$ %
2	0,4	0,412	103,00	
3	0,4	0,398	99,50	
4	0,5	0,509	101,80	
5	0,5	0,497	99,40	
6	0,5	0,491	98,20	
7	0,6	0,604	100,67	
8	0,6	0,599	99,83	
9	0,6	0,593	98,83	

Таблица 2

Количественное определение ацетонитрила в модельных растворах

№	Заложено, г	Измерено		Метрологические характеристики
		г	%	
1	0,0328	0,0334	101,83	Число определений $n = 9$, $f = n - 1 = 8$ Среднее значение $\bar{X} = 101,30$ % Дисперсия $S^2 = 3,68$ Среднее квадратичное отклонение $S = 1,92$ % Коэффициент Стьюдента t (95 %, f) = 2,31 Относительное стандартное отклонение $S_{\bar{X}} = 1,90$ % Доверительный интервал $\Delta\bar{X} = 1,48$ % Относительная погрешность $\bar{\varepsilon} = 1,46$ %
2	0,0328	0,0325	99,09	
3	0,0328	0,0339	103,35	
4	0,0410	0,0418	101,95	
5	0,0410	0,0424	103,41	
6	0,0410	0,0405	98,78	
7	0,0492	0,0500	101,63	
8	0,0492	0,0486	98,78	
9	0,0492	0,0506	102,85	

Таблица 3

Зависимость площадей пиков растворителей от их концентраций в растворе стандартного образца

Концентрация этанола 96 %, мг/мл	Площадь пика этанола 96 %, мВ×с	Высота сигнала этанола 96 %	Концентрация ацетонитрила, мг/мл	Площадь пика ацетонитрила, мВ×с	Высота сигнала ацетонитрила
2,500	9 350	2,70	0,2050	1 179	0,44
1,250	4 676	1,30	0,1025	591	0,22
0,625	2 339	0,60	0,0513	296	0,11
0,313	1 167	0,30	0,0256	148	0,06
0,156	583	0,14	0,0128	75	0,03
0,078	291	0,07	0,0064	достоверно определить невозможно	—
0,040	141	0,035	—	—	—
0,020	достоверно определить невозможно	—	—	—	—

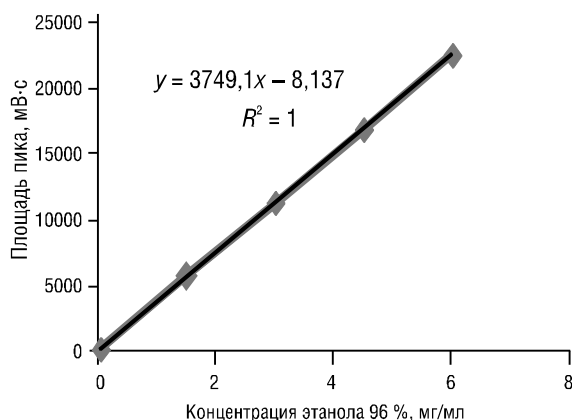


Рис. 4. График зависимости площади пика от концентрации этанола 96 %

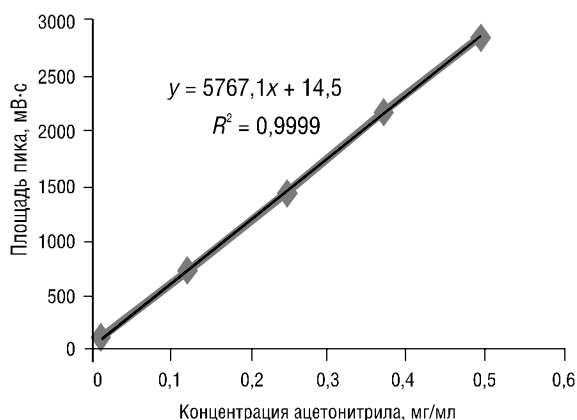


Рис. 5. График зависимости площади пика от концентрации ацетонитрила

По полученным данным были построены графики зависимости площади пика от концентрации этилового спирта 96 % и ацетонитрила. Значение квадрата коэффициента корреляции должно быть не менее 0,99 [7].

Согласно рис. 4 квадрат коэффициента корреляции для этилового спирта 96 % составил 1. Следовательно, зависимость площади пика от концентрации этилового спирта линейна.

Согласно рис. 5 квадрат коэффициента корреляции для ацетонитрила составил 0,999. Следовательно, зависимость площади пика от концентрации ацетонитрила линейна.

Предел количественного определения устанавливали путем измерения аналитических сигналов этилового спирта 96 % и ацетонитрила в процессе последовательного уменьшения их концентраций от максимальной концентрации (50 % от предельного значения) до концентрации, при которой соотношение сигнал/шум будет ≥ 10 . Коэффициент вариации результатов, полученных при шестикратном введении проб, должен быть меньше 15 % [8, 9].

На рис. 6 представлен фрагмент «шума» базовой линии на хроматограмме раствора диметилсульфоксида. Значение высоты сигнала «шума» базовой линии составило 0,003. Следовательно, минимальное значение высоты сигнала этилового спирта 96 % и ацетонитрила, при которой они могут быть достоверно определены, равно 0,03.

При тестировании методики определения остаточных органических растворителей в субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофуросана по параметру «предел количественного определения» выявлено, что предел количественного определения

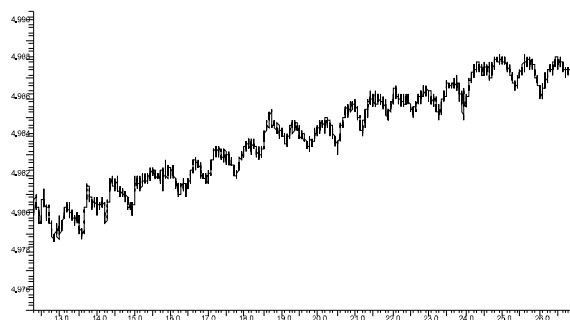


Рис. 6. Фрагмент «шума» базовой линии на хроматограмме раствора диметилсульфоксида

этанола 96 % составляет 0,04 мг/мл, а ацетонитрила 0,0128 мг/мл. Коэффициент вариации результатов, полученных при шестикратном введении этанола 96 % с концентрацией 0,04 мг/мл, составил 2,76 %, а при шестикратном введении ацетонитрила с концентрацией 0,0128 мг/мл – 7,71 %, что соответствует заявленному критерию.

Сходимость результатов анализа была оценена по результатам анализа шести отдельно приготовленных проб из одного образца субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофуросана. Значение коэффициента вариации для шести определений должно быть не более 4 % [9].

Промежуточная прецизионность методики была исследована в течение двух рабочих дней.

Значение коэффициента вариации для шести отдельно приготовленных проб из одного образца субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофуросана должно быть не более 4 % [9].

Согласно табл. 4 и 5 результаты количественного определения этилового спирта 96 % и ацетонитрила доказали удовлетворительную прецизионность методики.

Стабильность раствора субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана была определена путем сравнения площадей пиков на хроматограммах свежеприготовленного раствора субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана и «несвежего» раствора после хранения при комнатной температуре 20 ± 2 °C и при температуре +8 °C до возникновения нестабильности (до 7 дней). Максимальное отклонение от первоначального результата для раствора, который хранился при комнатной температуре, для этилового спирта 96 % составило 0,94 %, для ацетонитрила – 0,99 %, а для раствора, который хранился при температуре +8 °C, для этилового спирта 96 % составило 0,51 %, для ацетонитрила – 0,55 %. Процентное содержание этанола 96 % и ацетонитрила, полученное при анализе растворов субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана, не отклоняется от первоначального результата более чем на 2 %.

В процессе исследований установлено, что метод газовой хроматографии позволяет получить достоверные и надежные результаты, а также может быть использован для количественного определения остаточных органических растворителей в субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана.

Таблица 4
Содержание остаточных органических растворителей при анализе субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана

Обозначение анализа	Содержание этанола 96 %, %	Содержание ацетонитрила, %
Проба 1	0,298	0,0102
Проба 2	0,291	0,0100
Проба 3	0,301	0,0099
Проба 4	0,296	0,0100
Проба 5	0,293	0,0101
Проба 6	0,294	0,0098
Среднее значение, %	0,296	0,0100
Стандартное отклонение, %	0,0036	0,00014
Коэффициент вариации, %	1,22	1,40
Доверительный интервал ($P = 95$ %), %	$0,296 \pm 0,0038$	$0,0100 \pm 0,00015$

Проведенная валидация методики определения остаточных органических растворителей в субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана по показателям: специфичность, правильность, линейность, предел количественного определения, сходимость, промежуточная прецизионность, стабильность – позволила получить значения, соответствующие заявленным критериям. Методика может быть использована при аттестации стандартного образца субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана.

Таблица 5
Содержание остаточных органических растворителей при анализе субстанции 5,7-бис-(мета-нитрофениламино)-4,6-динитробензофураксана

Обозначение анализа	Содержание этанола 96 %, %		Содержание ацетонитрила, %	
	1-й день	2-й день	1-й день	2-й день
Проба 1	0,293	0,299	0,0100	0,0102
Проба 2	0,296	0,289	0,0101	0,0100
Проба 3	0,298	0,300	0,0100	0,0098
Проба 4	0,299	0,296	0,0099	0,0101
Проба 5	0,291	0,291	0,0101	0,0100
Проба 6	0,294	0,295	0,0103	0,0102
Среднее значение, %	0,295	0,295	0,0101	0,0101
Стандартное отклонение, %	0,0031	0,0043	0,00014	0,00015
Коэффициент вариации, %	1,05	1,46	1,39	1,49
Доверительный интервал ($P = 95$ %), %	$0,295 \pm 0,0031$	$0,295 \pm 0,0045$	$0,0101 \pm 0,00015$	$0,0101 \pm 0,00016$



ЛИТЕРАТУРА

1. Юсупова Л. М., Гармонов С. Ю., Захаров И. М., Быков А. Р., Гарипов Т. В., Фаляхов И. Ф. Средства биологической защиты многоцелевого назначения на основе хлорпроизводных нитробензофуросана // Вестн. Казан. технол. ун-та. 2004. № 1. С. 103–111.
2. ОСТ 42-506-96. Порядок согласования и утверждения нормативной документации на лекарственные средства и лекарственное растительное сырье.
3. ГОСТ 31811-2012. Спирт этиловый и спиртосодержащая продукция. М., 2013. 16 с.
4. ГОСТ Р 52249-2009. Правила производства и контроля качества лекарственных средств. М., 2009. 245 с.
5. ОФС 42-0004-00 «Остаточные органические растворители».
6. Гризодуб А. И., Губаревич И. Г., Карпова Т. А., Никишина Л. Е., Леонтьев Д. А. Стандартизованная процедура валидации методики контроля остаточных растворителей в лекарственных средствах методом газовой хроматографии // Фармаком. 2005. № 4. С. 5–21.
7. Эрмер Й., Миллер Дж. Валидация методики в фармацевтическом анализе. М., 2013. 495 с.
8. Руководство по валидации методики анализа лекарственных средств / под ред. Н. В. Юргеля, А. Л. Младенцева, А. В. Бурдейна, М. А. Гетьмана. М., 2007. 190 с.
9. Валидация аналитических методики для производителей лекарств / под ред. В. В. Береговых. М., 2008. 132 с.

VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURE FOR DETERMINATION OF RESIDUAL ORGANIC SOLVENTS FOR STANDARDIZATION THE SUBSTANCE OF 5,7-BIS-META-NITROPHENYLAMINO-4,6-DINITROBENZOFUROXAN

R. Sh. Markhabullina, L. M. Yusupova

The aim of this study was to develop and validate a gas chromatography methods of quantitative determination of residual organic solvents in substance of 5,7-bis-(meta-nitrophenylamino)-4,6-dinitrobenzofuroxan. Validation of elaborating methods of quantitative determination of residual organic solvents – ethyl alcohol and acetonitrile in substance of 5,7-bis-(meta-nitrophenylamino)-4,6-dinitrobenzofuroxan using gas chromatography method allowed to evaluate their metrology parameters. All parameters of validation characteristics met their acceptance criteria's. Specificity was demonstrated by a complete chromatographic separation of peaks of ethyl alcohol and acetonitrile, and lack of peaks of ethyl alcohol and acetonitrile in the chromatogram of solvent. The linearity was proven in the range of quantitation limit to 120 % of the test concentrations. Precision of the methods comply with the requirement defined – the relative standard deviation for of ethyl alcohol and acetonitrile below 3 %. The results of this validation study prove the suitability of the gas chromatography method for quantitative determination of residual organic solvents in substance of 5,7-bis-(meta-nitrophenylamino)-4,6-dinitrobenzofuroxan.

Key words: 5,7-bis-(meta-nitrophenylamino)-4,6-dinitrobenzofuroxan, validation, standardization.

