

УДК 543.544.5.068.7+543.061+543.062

**ЛИНЕЙНОСТЬ, ПРЕЦИЗИОННОСТЬ И УСТОЙЧИВОСТЬ
АНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ ОДНОВРЕМЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
1,2-ДИМЕТИЛ-3-ДИЭТИЛАМИНОПРОПАНОНА И ЕГО ПРОДУКТА
ВОССТАНОВЛЕНИЯ 1,2-ДИМЕТИЛ-3-ДИЭТИЛАМИНОПРОПАНОЛА**

Г.О. Торосян¹, А.С. Празян², Л.Р. Кочикян², Р.С. Григорян²

1. Национальный политехнический университет Армении

2. Научный центр экспертизы лекарств и медицинских технологий им. акад. Э. Габриеляна

Путем восстановления 1,2-диметил-3-диэтиламинопропанола боргидридом натрия в условиях межфазного катализа получен 1,2-диметил-3-диэтиламинопропанол со сравнительно высоким выходом. 1,2-диметил-3-диэтиламинопропанол является исходным соединением для синтеза лекарственных препаратов, в частности ганглерона и кватерона. Разработана аналитическая методика одновременного качественного и количественного определения 1,2-диметил-3-диэтиламинопропанола и 1,2-диметил-3-диэтиламинопропанола с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии. Исследованы линейность зависимости площадей пиков аминокетона от его концентрации, прецизионность, а также устойчивость метода к небольшим изменениям параметров методики. Для определения устойчивости были изменены состав подвижной фазы и рН буферного раствора, а также скорость потока и температура хроматографической колонки.

Ключевые слова: 1,2-диметил-3-диэтиламинопропанон, 1,2-диметил-3-диэтиламинопропанол, аналитический метод, высокоэффективная жидкостная хроматография, линейность, прецизионность, устойчивость.

Введение. 1,2-диметил-3-диэтиламинопропанол (аминоспирт) является исходным соединением для синтеза ганглерона и кватерона [1]. Ганглерон обладает выраженным действием на холинореактивные системы в центральной и вегетативной нервной системе. Его применяют главным образом для предупреждения приступов стенокардии [2]. Кватерон обладает коронарорасширяющим и гипотензивным действием. Препарат рекомендуется для лечения стенокардии, язвенной болезни и гипертонии [3].

Разработана аналитическая методика разделения и количественного определения 1,2-диметил-3-диэтиламинопропанола (аминокетон) и 1,2-диметил-3-диэтиламинопропанола с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). ВЭЖХ используется в повседневной работе в

фармацевтической промышленности и научной среде для разделения, количественного и качественного анализа соединений. ВЭЖХ в качестве официального метода давно используется в фармакопеех разных стран. Для ВЭЖХ разработан и выпускается широкий ассортимент сорбентов. В аналитической практике наибольшее применение находит обращенно-фазовый вариант хроматографии с использованием силикагеля с привитыми алкильными группами C18 и C8 [4]. В связи с доступностью колонки C18 и её сравнительно недорогой стоимостью в данной научной работе также была использована хроматографическая колонка с сорбентом C18.

Экспериментальная часть. Системы ВЭЖХ и хроматографические колонки, использованные в процессе, приведены в табл.1.

Таблица 1
Приборы и колонки, использованные в процессе

ВЭЖХ	HPLC - RID
Тип	Shimadzu-Japan
Детектор	Диодно-матричный детектор
Колонка	NUCLEOSIL 100-5 C18 размером 150 x 4,6 мм, диаметр частиц сорбента 5 мкм. Серийный номер: E13100095

Реактивы для хроматографии, использованные в процессе, перечислены в табл. 2.

Таблица 2
Реактивы, использованные в процессе

Вещества	Производитель
Дигидрофосфат калия	Carl Roth, Germany, 99,0%
Фосфорная кислота	Merck, Germany
Ацетонитрил	AppliChem, Germany, HPLC Grade, 99,9%
Вода	Milli-Q water purification system, Millipore, France

Методы и аналитические процедуры. Количественное определение 1,2-диметил-3-диэтиламинопропанона и 1,2-диметил-3-диэтиламинопропанола проводилось методом ВЭЖХ на приборе Shimadzu-Japan с диодно-матричным детектором, на колонке NUCLEOSIL 100-5 C18 размером 150 x 4,6 мм,

диаметром частиц сорбента 5 мкм фирмы Macherey-Nagel, Германия. Элюирование проводили в изократическом режиме (табл. 3).

Таблица 3

Параметры хроматографирования

Колонка	NUCLEOSIL 100-5 C18 размером 150 x 4,6 мм
Длина волны	200 нм
Скорость потока	1 мл/мин
Объем анализируемого раствора	20 мкл
Температура колонки	30°C
Режим элюирования	изократический
Подвижная фаза	ацетонитрил : 0,05МКН ₂ РО ₄ (рН=3,5)=5 : 95 (V/V)

Приготовление подвижной фазы. В плоскодонную колбу объемом 1 л помещают 950 мл 0,05 МКН₂РО₄ раствора. рН буфера с помощью ортофосфорной кислоты понижают до 3,5. Добавляют 50 мл ацетонитрила и раствор хорошо перемешивают. Подвижную фазу фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и дегазируют. Первые 10 мл фильтрата отбрасывают.

Стандартные растворы аминокетона и аминок спирта. Около 10 мг (точная навеска) стандартного образца аминокетона или аминок спирта переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, и объем раствора в колбе доводят при помощи подвижной фазы до метки (0,4 мг/мл).

Испытуемый раствор. Точную навеску 25 мг реакционной смеси переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и добавляют 10 мл подвижной фазы. Раствор оставляют в ультразвуковой ванне на 10 минут, после объем раствора в колбе доводят подвижной фазой до метки. Полученный раствор фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Линейность метода количественного определения аминокетона. Линейная зависимость должна быть исследована в пределах диапазона применения аналитической методики. Она может быть подтверждена непосредственно на активной субстанции (путем разбавления исходного раствора) [5,6]. Линейность - это способность методики (в пределах диапазона применения) получать результаты испытаний, прямо пропорциональные концентрации (количеству) анализируемого вещества в образце.

Растворы готовят в следующей концентрации 0,32; 0,36; 0,40; 0,44; 0,48 мг/мл, что соответствует 80...120% концентрации аминокетона.

Полученный результат представлен на рисунке.

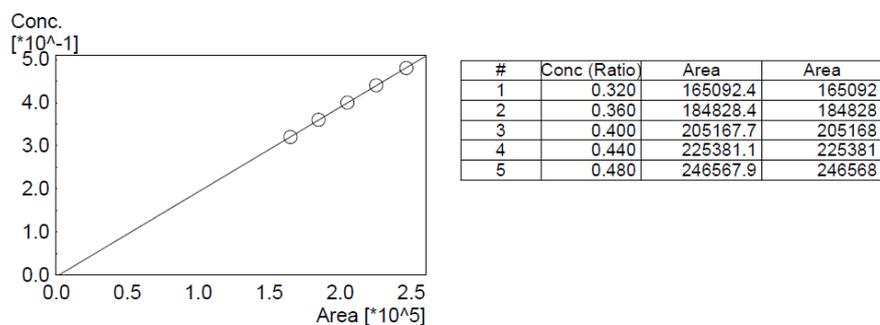


Рис. Линейность аминокетона

Для данного диапазона концентраций была выбрана линейная функция отклика площади пика стандарта от концентрации, рассчитанная методом наименьших квадратов с весовым коэффициентом $1/x$. Из приведенных данных видно, что для диапазона ожидаемых концентраций в растворах наблюдается линейная зависимость с коэффициентом корреляции $r^2 > 0,995$ (0,9998523). Выявленная нелинейность не обнаружена. Это свидетельствует о надлежащей линейности метода.

Прецизионность, сходимость. Сходимость изучают, выполняя не менее шести определений для образцов с содержанием анализируемого вещества, близким к номинальному [5,6]. Стандартный раствор готовят согласно описанной методике и инъецируют шесть раз. Относительное стандартное отклонение (RSD) площади пика аминокетона составило 0,1064258%. Результаты испытания приведены в табл. 4. Низкое значение RSD свидетельствует о том, что прецизионность системы надлежащая ($RSD < 2\%$).

Таблица 4
Результаты определения прецизионности системы

Номер инъекции	Площадь пика аминокетона
1	206601
2	206505
3	206025
4	206381
5	206153
6	206223
Среднее значение	206315
RSD, %	0,1064258

Устойчивость. Оценку устойчивости проводят на стадии разработки методики с учетом типа изучаемой методики. Эта оценка должна доказать надежность результатов анализа при небольших изменениях параметров методики. Для определения устойчивости метода были изменены состав подвижной фазы и pH буферного раствора, а также скорость потока и температура колонки. Состав использованной подвижной фазы изменяли по 4-ем вариантам и инъецировали при нормальных условиях, а скорость потока и температура колонки остались без изменений (варианты 1-4). Состав нормальной подвижной фазы остался без изменений, а скорость потока и температура колонки были изменены (варианты 5-8). Результаты испытаний приведены в табл.6-9.

Применялись следующие запланированные изменения (см. табл. 5).

Таблица 5

Метод	Подвижная фаза «А»: 95% буферный раствор (pH=3,5)
Заданные условия	Подвижная фаза «Б»: 5% ацетонитрил Температура колонки: 30°C Скорость потока: 1,0 мл/мин
Вариант 1	Подвижная фаза «А»: 94% буферный раствор (pH=3,5) Подвижная фаза «Б»: 6% ацетонитрил
Вариант 2	Подвижная фаза «А»: 96% буферный раствор (pH=3,5) Подвижная фаза «Б»: 4% ацетонитрил
Вариант 3	Подвижная фаза «А»: 95% буферный раствор (pH=3,3) Подвижная фаза «Б»: 5% ацетонитрил
Вариант 4	Подвижная фаза «А»: 95% буферный раствор (pH=3,7) Подвижная фаза «Б»: 5% ацетонитрил
Вариант 5	Скорость потока: 0,9 мл/мин
Вариант 6	Скорость потока: 1,1 мл/мин
Вариант 7	Температура колонки: 28°C
Вариант 8	Температура колонки: 32°C

Испытуемый раствор готовили согласно условиям, изложенным в методике аналитического испытания. Параметры пригодности системы, установленные в методике аналитического испытания, рассчитывались для всех вариантов.

Таблица 6

Устойчивость: сравнение результатов вариантов 1 – 4 согласно условиям, заданным в методике

N образца	Площадь пика аминокетона				
	норма согласно методике	вариант 1	вариант 2	вариант 3	вариант 4
1	76431	72545	76003	20036	20546
2	76494	72762	76273	20804	20790
3	76462	72327	76603	20845	20799
4	76480	72516	76356	20305	20633
5	76459	72684	76389	20246	20462
6	76473	72452	76299	20892	20589
Среднее значение	76466,5	72547,6667	76320,5	20521,3333	20636,5
RSD, %	0,0281549	0,2165291	0,2549354	1,7973446	0,6532917

Таблица 7

Устойчивость: сравнение результатов вариантов 5 – 8 согласно условиям, заданным в методике

N образца	Площадь пика аминокетона				
	норма согласно методике	вариант 5	вариант 6	вариант 7	вариант 8
1	76431	85284	68741	75431	78182
2	76494	85203	68761	75784	78726
3	76462	85312	68755	75559	78957
4	76480	85264	68863	75564	78796
5	76459	85432	68697	75769	78964
6	76473	85277	68753	75433	78698
Среднее значение	76466,5	85295,3333	68761,6667	75590	78720,5
RSD, %	0,0281549	0,0891752	0,0796481	0,2060064	0,3644033

Таблица 8

Устойчивость: сравнение результатов вариантов 1 – 4 согласно условиям, заданным в методике

N образца	Площадь пика аминспирта				
	норма согласно методике	вариант 1	вариант 2	вариант 3	вариант 4
1	110153	110890	108335	88925	88988
2	110602	111222	108570	88268	88974
3	110897	112259	108037	88489	88857
4	110596	110633	108614	88125	88693
5	110398	111851	108841	88756	88756
6	110116	111659	108723	88697	88632
Среднее значение	110460,333	111419	108520	88543,3333	88816,6667
RSD, %	0,2703983	0,5512615	0,2680567	0,3456279	0,1660954

Таблица 9

Устойчивость: сравнение результатов вариантов 5 – 8 согласно условиям, заданным в методике

N образца	Площадь пика аминспирта				
	норма согласно методике	вариант 5	вариант 6	вариант 7	вариант 8
1	110153	148885	112270	103411	106556
2	110602	148371	112873	103215	106319
3	110897	148564	112689	103003	106117
4	110596	148698	112534	103641	106587
5	110398	148632	112358	103264	106253
6	110116	148979	112963	103987	106941
Среднее значение	110460,333	148688,167	112614,5	103420,167	106462,167
RSD, %	0,2703983	0,1481412	0,2463347	0,3379168	0,2777082

Параметры пригодности системы, установленные в методике, были выполнены для всех вариантов. Это свидетельствует об устойчивости методики в отношении установленных норм пригодности системы в методике.

Заключение. Исследованы линейность зависимости площадей пиков аминокетона от его концентраций, прецизионность, а также устойчивость

метода к небольшим изменениям параметров методики. Выраженная нелинейность не обнаружена, что свидетельствует о надлежащей линейности метода. Относительное стандартное отклонение (RSD) площади пика аминокетона составило 0,1064258%. Низкое значение RSD свидетельствует о том, что прецизионность системы надлежащая (RSD < 2%). Для определения устойчивости метода были изменены состав подвижной фазы и pH буферного раствора, а также скорость потока и температура колонки. Параметры пригодности системы, установленные по методике, были выполнены для всех вариантов. Это свидетельствует об устойчивости методики.

Литература

1. 1,2-դիմեթիլ-3-դիէթիլամինապրոպանոնի վերականգնումը համապատասխան սպիրտի միջֆազային կատալիզի պայմաններում / **Գ.Հ. Թորոսյան, Ա.Ս. Պռազյան, Ա.Խ. Նազարեթյան և ուրիշներ** // Հայաստանի ճարտարագիտական ակադեմիայի Լրաբեր. - 2010.- Հ.7, №2.- էջ 366-368:
2. Производственный регламент “Ганглерон”. – Ереван, 1981.
Производственный регламент “Кватерон”. – Ереван, 1981.
3. **Яшин Я.И., Яшин А.Я.** Высокоэффективная жидкостная хроматография. Состояние и перспективы // РХЖ. – 2003. - Т.17. - С. 64-78.
4. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности / **Н.В. Юргель, А.Л. Младенцев, А.В. Бурдейн и др.** // Методические рекомендации.- М., 2007.- Часть 1. – С. 22-34.
5. Validation of chromatographic methods // Reviewer Guidance. - 1994.- P.11-16.

*Поступила в редакцию 12.01.2015.
Принята к опубликованию 27.08.2015.*

1,2-ԴԻՄԵԹԻԼ-3-ԴԻԷԹԻԼԱՄԻՆԱՊՐՈՊԱՆՈՆԻ ԵՎ ՆՐԱ ՎԵՐԱԿԱՆԳՆՄԱՆ ԱՐԳԱՍԻՔ 1,2-ԴԻՄԵԹԻԼ-3-ԴԻԷԹԻԼԱՄԻՆԱՊՐՈՊԱՆՈՆԻ ՄԻԱԺԱՄԱՆԱԿՅԱ ՈՐՈՇՄԱՆ ԱՆԱԼԻՏԻԿ ՄԵԹՈԴԻ ԳԾԱՅՆՈՒԹՅՈՒՆԸ, ՃՇԳՐՏՈՒԹՅՈՒՆԸ ԵՎ ԿԱՅՈՒՆՈՒԹՅՈՒՆԸ

Գ.Հ. Թորոսյան, Ա.Ս. Պռազյան, Լ.Ռ. Ղոչիկյան, Ռ.Ս. Գրիգորյան

Միջֆազային կատալիզի պայմաններում նատրիումի բորահիդրիդով 1,2-դիմեթիլ-3-դիէթիլամինապրոպանոնի վերականգնմամբ ստացվում է 1,2-դիմեթիլ-3-դիէթիլամինապրոպանոլ՝ բարձր ելքով: 1,2-դիմեթիլ-3-դիէթիլամինապրոպանոլը ելանյութ է գանգլերոն և քվատերոն դեղերի սինթեզի համար: Մշակվել է 1,2-դիմեթիլ-3-դիէթիլամինապրոպանոնի և 1,2-դիմեթիլ-3-դիէթիլամինապրոպանոլի որակական և քանակական միաժամանակյա որոշման անալիտիկ մեթոդ՝ բարձրարդյունավետ հեղուկային քրոմատագրությամբ:

եղանակով: Այս անալիտիկ մեթոդով հետազոտվել է ամինակետոնի լարվածակետի մակերեսի գծային կախվածությունը կոնցենտրացիայից, ինչպես նաև մեթոդի ճշգրտությունը, որոշակի պարամետրերի փոփոխությամբ՝ մեթոդի կայունությունը: Մեթոդի կայունության որոշման համար փոփոխվել են շարժուն ֆազի բաղադրությունը և բուֆերային լուծույթի pH-ը, ինչպես նաև շարժուն ֆազի հոսքի արագությունը և քրոմատագրական աշտարակի ջերմաստիճանը:

Առանցքային բաներ. 1,2-դիմեթիլ-3-դիէթիլամինապրոպանոն, 1,2-դիմեթիլ-3-դիէթիլամինապրոպանոլ, անալիտիկ մեթոդ, բարձրարդյունավետ հեղուկային քրոմատագրություն, գծայնություն, ճշգրտություն, կայունություն:

LINEARITY, PRECISION AND STABILITY OF THE ANALYTICAL METHOD OF SIMULTANEOUS DETERMINATION OF 1,2-DIMETHYL-3-DIETHYLAMINOPROPANON AND ITS REDUCED PRODUCT 1,2-DIMETHYL-3-DIETHYLAMINOPROPANOL

G.H. Torosyan, A.S. Prazyan, L.R. Ghochikyan, R.S. Grigoryan

1,2-dimethyl-3-diethylaminopropanol is obtained with relatively high yield by reduction of 1,2-dimethyl-3-diethylaminopropanon with sodium borohydride interphase transfer catalysis under the conditions of 1,2-dimethyl-3-diethylaminopropanol is an initial material for different drugs, such as gangleronum and quateronum. A novel and accurate high performance liquid chromatography method was developed for simultaneous qualitative and quantitative determination of 1,2-dimethyl-3-diethylaminopropanon and 1,2-dimethyl-3-diethylaminopropanol. The linearity of the dependence of the aminoketone peak areas on its concentration, precision and the stability of the method to small changes of the parameters is investigated. For assessing the stability, several chromatographic conditions were changed, such as the composition of mobile phase, its pH, mobile phase flow rate and chromatographic column temperature.

Keywords: 1,2-dimethyl-3-diethylaminopropanon, 1,2-dimethyl-3-diethylaminopropanol, analytical method, high-performance liquid chromatography, linearity, precision, stability.