



О.В. Гречана

Метрологічне та нормативно-технічне забезпечення методик виявлення та визначення лікарських засобів, похідних кумарину

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: похідні кумарину, лікарські засоби, температура топлення, вміст домішок.

Розроблено методики ідентифікації лікарських засобів, похідних кумарину, на основі їх фізико-хімічних констант (hR_p , температура топлення, °C, вміст домішок, визначення кількісного вмісту).

Метрологическое и нормативно-техническое обеспечение методик обнаружения и определения лекарственных средств, производных кумарина

Е.В. Гречаная

Разработаны методики идентификации лекарственных средств, производных кумарина, на основе их физико-химических констант (hR_p , температура плавления, °C, содержание примесей, определение количественного содержания).

Ключевые слова: производные кумарина, лекарственные средства, температура плавления, содержание примесей.

Measurement and regulatory and technical support techniques for the detection and determination of drugs, coumarin derivatives

E.V. Grechana

Methods of identification for drugs - coumarin derivatives which based on their physical and chemical constants (hR_f , melting point, °C, the content of impurities, determination of the qualitative content). were described in presented article.

Key words: coumarin derivatives, drugs, melting point, impurity content.

Молекула кумарину (бензо- α -пірон) належить до групи лікарських засобів, що виявляють різноманітні фармакологічні властивості. Їх широко застосовують у клінічній практиці при лікуванні різних захворювань [4], і тому цілком зрозуміла зацікавленість, яку проявляють науковці до вивчення фізико-хімічних властивостей зазначеної групи речовин, а також до встановлення метрологічного та нормативно-технічного забезпечення методик їх якісного та кількісного визначення [1].

Мета роботи

Вивчення та розробка відповідності досліджуваних лікарських засобів вимогам фармакопейного та хіміко-токсикологічного аналізу [3,8], а також здійснення метрологічного і нормативно-технічного обґрунтування розроблених нами методик з ідентифікації, контролю домішок і кількісного визначення, застосованих при дослідженні похідних кумарину, дикумарину, неодикумарину, фепромарону, синкумару, карбакромену та варфарину натрію клатрату.

Основні групи показників якості досліджуваних речовин та аналітичні методики, що застосовуються в деяких випадках, відрізняються для субстанцій і готових лікарських засобів, однак їх комплексне застосування дозволяє отримати повну інформацію про якість досліджуваних лікарських засобів [5,6].

Дослідження з розробки методик аналізу конкретних субстанцій лікарських засобів мають свою специфіку, оскільки субстанції являють собою полікомпонентні суміші речовин (діюча речовина та домішки). Тому результати аналізу, отримані різними методами (оптичні,

хроматографічні, об'ємні), відрізняються за припустимими межами. Беручи до уваги доволі жорсткі вимоги до допуску вмісту діючої речовини та домішок у субстанціях лікарських засобів, для отримання відтворюваних результатів необхідна обов'язкова регламентація застосованих методів і методик аналізу, умов їх проведення, використаних реактивів і стандартних зразків, що вкрай необхідно при проведенні фармацевтичного та хіміко-токсикологічного аналізів [7,9].

Матеріали і методи дослідження

Стандартні зразки кумарину та 4-оксикумарину отримано від ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». Всі використані розчинники та хроматографічні матеріали мали кваліфікацію «х. ч.».

Для нанесення проби досліджуваних речовин використано мікрошприц фірми «Merck» виробництва ФРН. У якості носія – пластинки для тонкошарової хроматографії «Alugram®» SIL G / UV₂₅₄ розмірами 20×20 см серії 610/284 (ФРН).

Для визначення температури топлення досліджуваних сполук використано прилад для автоматичного визначення зазначеної константи моделі FP 62 Mettler-Toledo (Швейцарія).

Результати та їх обговорення

Розробку умов хроматографування (вибір систем розчинників, сорбенту, способу та чутливості детектування) проводили, враховуючи дані наукової літератури [2], а також на основі власних досліджень.

Оцінку фактичного вмісту домішок і визначення температури топлення здійснювали тільки для дикумарину, неодикумарину, фепромарону, синкумару та варфарину натрію клатрату, оскільки досліджували якість відповідних субстанцій, наданих заводами-виробниками, відповідно до вимог методик контролю їх якості [2].

Концентрація досліджуваних похідних кумарину у всіх випадках складала 0,005 М. Детектування хроматограм виконано в УФ-світлі (245 нм). Чутливість детектування методики при цьому складала 0,007 мкг (табл. 1).

Системи розчинників з відносним складом компонентів:

- С – 1 н – бутанол – кислота етанова – вода (4 : 1 : 5);
- С – 2 хлороформ – кислота етанова – вода (10 : 4 : 5);
- С – 3 етилацетат – кислота метанова – вода (3 : 1 : 1);
- С – 4 етилацетат – кислота етанова – вода (3 : 3 : 1);
- С – 5 н – бутанол – кислота метанова – вода (4 : 1 : 5);
- С – 6 н – бутанол, насичений 10% кислотою етановою.

Відстань пробігу розчинника – 15 см.

Детектування хроматограми – в УФ-світлі.

Чутливість детектування – 0,007 мкг.

Слід зазначити, що питання відповідності роздільної здатності готових ТШХ-пластинок до вимог загальної статті «Тонкошарова хроматографія» 2.2.27 [3] слід розглядати не тільки враховуючи результати експерименту. Необхідно впровадити систематичне дослідження фактичної відтворюваності отриманих значень hR_f на основі статистичної обробки, що дозволяє виконати оцінку їх незначної відмінності. За результатами такої роботи завжди можна виконати оцінку хроматографічних харак-

теристик (hR_f) при контролі якості лікарських засобів і вжити корегуючі заходи. Статистичну обробку виконано за методикою ДФУ [3], результати наведено у таблиці 1. З результатів статистичної обробки за значеннями довірчого інтервалу (t_s) та відносного стандартного відхилення (RSD) інтервал відтворюваності величин hR_f у здійснених дослідженнях відповідає вимогам ДФУ [1] за відтворюваністю отриманих характеристик у рамках визначеної кількості паралельних дослідів ($n=6$).

При оцінюванні фактичного вмісту домішок в аналізованих сполуках взято до уваги рекомендації Міжнародної Фармакопеї з виявлення вторинних алкалоїдів маткових ріжків методом ТШХ [9].

Методика виявлення домішок: 0,1 г досліджуваної речовини розчиняли у 50 мл 95% спирту етилового та наносили на хроматографічні пластинки у кількостях від 10 до 1 мкл за допомогою мікрошприцу фірми «Merck» виробництва ФРН. Відстань пробігу розчинника складала 15 см. Після розділення речовин у зазначених системах розчинників і детектування їх хроматографічних зон визначено мінімальний об'єм робочого розчину, у якому визначали домішки (плями на межі видимості). Розрахунок відсоткового вмісту домішок виконано за рівнянням:

$$m = \frac{\eta}{a \cdot b} \cdot 100$$

- де m – відсотковий вміст домішок у речовині;
- η – чутливість методики (мкг);
- a – умовний вміст речовин у робочому розчині;
- b – мінімальний об'єм робочого розчину, у якому детектують домішки (мкл).

Таблиця 1

Величини hR_f ($R_f \times 100$) похідних кумарину у різних системах розчинників ($n=6$)

Досліджувана речовина	C-1			C-2			C-3			C-4			C-5			C-6		
	$h R_f$	t_s	R SD	$h R_f$	t_s	R SD	$h R_f$	t_s	R SD	$h R_f$	t_s	R SD	$h R_f$	t_s	R SD	$h R_f$	t_s	R SD
Дикумарин	78	2,09	2,69	73	1,27	1,73	46	2,14	4,66	59	1,67	2,84	65	0,89	1,38	70	1,27	1,81
Неодикумарин	70	1,41	2,02	82	1,27	1,54	53	1,79	3,38	60	1,41	2,36	55	1,79	3,25	54	2,53	4,68
Фепромарон	60	1,27	2,11	49	1,10	2,24	66	1,55	2,35	50	1,41	2,83	74	1,90	2,56	85	1,10	1,29
Синкумар	51	1,79	3,51	67	2,00	2,99	59	1,41	2,40	83	1,41	1,70	87	1,27	1,45	58	1,41	2,44
Карбакромен	42	1,41	3,37	47	2,83	6,02	62	2,10	3,38	54	1,41	2,62	83	1,41	1,70	79	0,89	1,13
Варфарин натрію клатрат	20	2,10	10,49	64	1,55	2,42	57	0,89	1,57	61	1,67	2,74	73	0,89	1,22	64	0,89	1,40

Таблиця 2

Аналітичні константи і вміст домішок у досліджуваних лікарських засобах

Лікарський засіб	Аналітичні константи		
	Температура топлення (°C)	Вміст за МКЯ (%± Δx)	Вміст домішок, (%± Δx)
Дикумарин	290–292	99,81±0,4818	0,07±0,0378
Неодикумарин	176–178	100,01±0,1130	0,09±0,0343
Фепромарон	150–151	99,73±0,4710	0,15±0,1168
Синкумар	195–196	99,70±0,3935	0,06±0,0486
Карбакромен	156–158	99,65±0,3548	0,06±0,0535
Варфарин натрію клатрат*	160–161	98,81±0,9795	0,02±0,0234

Примітка: * – температура топлення для варфарину – основи.

При аналізі досліджуваних сполук встановлено, що вміст домішок був у межах від 0,06% до 0,15% (табл. 2).

Статистичну обробку аналітичних констант, що вказують на кількість досліджуваних сполук в аналізованих лікарських препаратах за методиками МКЯ, та відсоткового вмісту домішок здійснено за методиками, рекомендованими ДФУ [3]. У всіх випадках кількість виконаних досліджень (n) дорівнювала 6. У таблиці 2 наведено значення довірчого інтервалу (t_0).

Усі досліджувані сполуки перед визначенням температури топлення та хроматографуванням очищували методом багаторазової перекристалізації та висушування до постійної маси та ультрафіолетового спектру. Додатково аналізовані сполуки кількісно визначали офіційними методами.

Визначені величини hR_p , температура топлення $^{\circ}\text{C}$, відсотковий вміст аналізованої речовини за діючими МКЯ та домішок у досліджуваних зразках лікарських засобів

у всіх випадках були середніми з шести паралельних дослідів (табл. 1, 2).

Висновки

1. Вивчено відповідність дикумарину, неодикумарину, фепромарону, синкумару, карбокромену та варфарину натрію клатрату до вимог фармакопейного та хіміко-токсикологічного аналізу.

2. Розроблено методики хроматографічного дослідження дикумарину, неодикумарину, фепромарону, синкумару, карбокромену та варфарину натрію клатрату у шести системах рухомої фази.

3. Визначено вміст домішок у досліджуваних лікарських засобах, похідних кумарину, кількісний вміст яких був у межах від 0,06 до 0,15%.

4. Отримані фізико-хімічні константи можуть бути використані для ідентифікації досліджуваних сполук, похідних кумарину.

Список літератури

1. Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств: Монография: В 3 т. / Под ред. В.П. Георгиевского. – Х., НТМТ, 2011. – Т. 1. – 464 с.
2. Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств: Монография: В 3 т. / Под ред. В.П. Георгиевского. – Х., НТМТ, 2011. – Т. 2. – 474 с.
3. Державна Фармакопея України / ДП «Наук.-експ. фармакопейний центр» – 1-е вид. – Х.: РІРЕГ, 2001. – 556 с.
4. Машковский М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский. – М.: Новая волна, 2010. – 1216 с.
5. Метрологические аспекты официальных методик контроля качества лекарственных средств. 3. Выполнение теста «Количественное определение» при одновременном контроле качества нескольких образцов лекарственных средств хроматографическими методами / Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Доценко Т.Н., Денисенко Н.В. // Фармаком. – 2004. – №2. – С. 9–19.
6. Тонкошарова хроматографія // Державна Фармакопея України / ДП «Наук.-експ. фармакопейний центр» – 1-е вид. – Х.: РІРЕГ, 2001. – С. 41–44; Доповнення 1 – 2004.
7. Фланаган Р.Дж. Основы аналитической токсикологии / Р.Дж. Фланаган. – Женева: Всемирная организация здравоохранения, 1997. – 364 с.
8. Moffat C. Anthony. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons / Anthony C. Moffat, M. David Osselton, Brian Widdop. – 4 th Rev. ed. – Pharmaceutical Press, 2011. – 2471 p.
9. The International Pharmacopea [Електронний ресурс] – 80 Min / 700MB. – Genueva: WHO, 2008. – 1 електрон. опт. диск (CD – ROM); 12 см. – систем. вимоги: Pentium; 32 MB RAM.

Відомості про автора:

Гречана О.В., к. фарм. н., ст. викладач каф. фармакогнозії, фармакології та ботаніки ЗДМУ.

Надійшла в редакцію 13.02.2013 р.