

АНАЛІЗ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ

Рекомендована д. біол. наук, проф. Л. С. Фірою

УДК 615.453.6:54.061

РОЗРОБКА МЕТОДИК ІДЕНТИФІКАЦІЇ ДІЮЧИХ ІНГРЕДІЄНТІВ ОРИГІНАЛЬНОГО КОМБІНОВАНОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ – ТАБЛЕТОК «МІГРЕПІН»

© Н. Ю. Бевз, Т. В. Звягінцева, Г. О. Сирова, В. А. Георгіянц, В. О. Грудько

Харківський національний медичний університет, Харків

Національний фармацевтичний університет, Харків

Резюме: для ідентифікації діючих інгредієнтів таблеток «Мігрепін» відповідно до вимог ДФУ запропоновано використовувати УФ-спектроскопію, тонкошарову хроматографію та хімічні реакції.

Ключові слова: ідентифікація, анальбен, кофеїн, карбамазепін.

Вступ. Створення, вивчення та активне впровадження в медичну практику вітчизняних препаратів найважливіших фармакотерапевтичних груп, які б мали доведену ефективність, безпечність і високий рівень якості, є однією із задач «Концепції розвитку фармацевтичного сектора галузі охорони здоров'я України на 2011–2020 роки».

Останнім часом розробники фармацевтичних засобів велику увагу приділяють комбінованим композиціям, що дозволяє об'єднати необхідні фармакологічні ефекти та зменшити побічні, обмежити використання баластних допоміжних речовин. Такий підхід є виправданим для лікування різних патологій.

Одним з таких препаратів, розроблених у Харківському національному медичному університеті, є фармацевтична композиція з політропним спектром фармакологічної дії під умовною назвою «Мігрепін». Препарат має анальгетичну, протизапальну, антимігренозну, жарознижувальну, антиоксидантну дію та є перспективним для купірування ряду больових синдромів запального генезу, мігрені [1–6]. Сумарний фармакологічний ефект зумовлений його інгредієнтами: кофеїном, карбамазепіном та анальбеном (калію 2,4-дихлорбензоатом) – оригінальною синтетичною субстанцією розробки НФаУ [7, 8, 9].

Для впровадження лікарських засобів у фармацевтичне виробництво необхідним є не тільки розробка складу і технології, але й стандартизація кінцевого продукту виробництва, що дозволить бути впевненим у його якості і, відповідно, у терапевтичній ефективності. Наявність всіх інгредієнтів у лікарському препараті підтверджується тестом «ідентифікація». Метою даного дослідження є розробка методик ідентифікації активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) таблеток «Мігрепін».

При розробці методик тесту «ідентифікація» Державна фармакопея України рекомендує ви-

користовувати комбінацію фізико-хімічних методів та хімічних реакцій, що дозволяє зробити всебічну оцінку складових компонентів. Серед фізико-хімічних методів найпоширенішими є спектральні та хроматографічні [10,11].

Методи дослідження. Для проведення досліджень використовували експериментальну партію таблеток «Мігрепін»; субстанції анальбену, кофеїну та карбамазепіну, які відповідають вимогам ДФУ. Для роботи застосовували мірний посуд класу А, реактиви, які відповідають вимогам ДФУ, аналітичні ваги «АХІS», спектрофотометр «SPECORD 200», тонкошарові пластинки з шаром силікагелю GF²⁵⁴.

Спектрофотометричне визначення.

1,0 мл розчину 0,001% спиртового розчину анальбену доводять 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої до 100,0 мл. 1,0 мл розчину 0,001% спиртового розчину кофеїну доводять 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої до 100,0 мл. 1,0 мл розчину 0,001 % спиртового розчину карбамазепіну доводять 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої до 100,0 мл. 0,1 мл розчину анальбену, 0,25 мл розчину кофеїну та 1,0 мл розчину карбамазепіну вміщують у мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм розчину 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої до мітки і перемішують (модельна суміш).

Хроматографічне визначення.

Використовують метод тонкошарової хроматографії (ТШХ), використовуючи ТШХ пластинки з шаром силікагелю GF²⁵⁴.

Випробуваний розчин. До наважки 200 мг порошку таблеток додають 8 мл спирту етилового Р, збовтують протягом 3 хв, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл, перемішують і фільтрують.

Розчин порівняння (а). 100 мг СЗ карбамазепіну розчиняють у спирті етиловому Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Розчин порівняння (b). 25 мг СЗ анальбену розчиняють у спирті етиловому Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Розчин порівняння (c). 10 мг СЗ кофеїну розчиняють у спирті етиловому Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

Розчин порівняння (d). 100 мг СЗ карбамазепіну, 25 мг СЗ анальбену і 10 мг СЗ кофеїну розчиняють у спирті етиловому Р і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл.

На лінію старту хроматографічної пластинки наносять 20 мкл (200 мкг) випробуваного розчину, 20 мкл (200 мкг) розчину порівняння (a), 20 мкл (50 мкг) розчину порівняння (b), 20 мкл (20 мкг) розчину порівняння (c), 20 мкл (200 мкг) карбамазепіну, 50 мкг кофеїну, 20 мкг анальбену розчину порівняння (d) і сушать. Пластинку поміщають у камеру із сумішшю розчинників хлороформ Р – спирт етиловий Р – гексан Р (1:1:2). Коли фронт розчинників пройде 15 см від лінії старту, пластинку виймають із камери, сушать у струмені теплого повітря та виявляють парами йоду.

На хроматограмі випробуваного розчину виявилися плями на рівні плям на хроматограмі розчинів порівняння a, b і c відповідні їм за розміром та забарвленням.

Результати аналізу вважаються вірогідними, якщо на хроматограмі розчину порівняння (d) виявляються три чітко розділені плями.

0,5 г порошку розтертих таблеток збовтують із 10 мл суміші води Р і спирту Р у співвідношенні 1:1, фільтрують і розділяють отриманий фільтрат на чотири частини. 5 мл отриманого фільтрату випаровують на водяній бані досуха. До залишку додають 0,1 мл розчину водню пероксиду концентрованої Р і 0,3 мл кислоти хлористоводневої розведеної Р і упарюють на водяній бані до одержання сухого жовтувато-червоного залишку. Охолоджують. До залишку додають 0,1 мл аміаку розведеного Р – колір залишку змінюється на червоно-фіолетовий. До 2 мл отриманого фільтрату додають 0,05 мл розчину калію йодиду йодованого Р, розчин залишається прозорим. До одержаного розчину додають 0,1 мл кислоти хлористоводневої розведеної Р – утворюється осад коричневого кольору (реакції на кофеїн). До 1 мл отриманого фільтрату додають 1 мл кислоти оцтової розведеної Р і 1 мл свіжовиготовленого розчину 100 г/л натрію кобальтнітриту Р – відразу утворюється оранжево-жовтуватий осад. До 2 мл отриманого фільтрату додають 1 мл розчину натрію карбонату Р і нагрівають, осад не утворюється. До гарячого розчину додають 0,05 мл розчину натрію сульфідату Р; осад не утворюється. Розчин охолоджують у льодяній воді, додають 2 мл роз-

чину 150г/л кислоти винної Р, і відстоюють – утворюється кристалічний осад (реакції на калій).

0,5 г порошку розтертих таблеток збовтують із 5 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду, фільтрують і розділяють отриманий фільтрат на дві частини. До 1 мл одержаного фільтрату додають 0,5 мл розчину заліза (III) хлориду Р – утворюється рожево-жовтий осад. До 1 мл одержаного фільтрату додають 0,5 мл розчину купрум(II) сульфату – утворюється зеленувато-блакитний осад (реакції на анальбен)..

0,5 г порошку розтертих таблеток збовтують із 5 мл спирту етилового Р, фільтрують. До фільтрату додають 0,5 мл розчину натрію нітриту Р і 2-3 краплі кислоти сірчаної концентрованої Р – утворюється жовте забарвлення (реакція на карбамазепін).

Результати й обговорення. Одним із широко вживаних методів ідентифікації ГЛЗ є адсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій ділянці спектра. Нами було досліджено УФ-спектри розчинів окремих інгредієнтів та модельної суміші таблеток «Мігрепін» (рис. 1). УФ-спектр 0,001% розчину анальбену у 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої характеризується наявністю інтенсивної короткохвильової смуги поглинання з максимумом при довжині хвилі 208 нм, смуги середньої інтенсивності з максимумом при 241 нм та широкого низькоінтенсивного плато в межах 268-294 нм (див. рис. 1).

Спектр кофеїну (див. рис. 1) також має інтенсивний короткохвильовий максимум при 206 нм, похилу ділянку між двома перегинами смуги вбирання при 226-236 нм та гетероароматичний максимум при 272 нм.

Адсорбційний спектр карбамазепіну (див. рис. 1) характеризується інтенсивною смугою при 212 нм, подвійним перегином смуги вбирання при 230 нм, 234 нм, який переходить у похиле плато в межах 234-238 нм та широким середньоінтенсивним максимумом при 285 нм.

Таким чином, усі три АФІ таблеток «Мігрепін» мають інтенсивні короткохвильові максимуми на ділянці від 206 до 212 нм, максимум або перегини смуги вбирання на ділянці 226 – 241 нм та плато або широку смугу вбирання в межах 268 – 285 нм.

УФ-спектр розчину модельної суміші таблеток «Мігрепін» у 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої (див. рис. 1) є сумою спектрів усіх трьох АФІ відповідно до їх вмісту у препараті. Він закономірно має інтенсивний короткохвильовий максимум при довжині хвилі 210 нм, подібно до карбамазепіну подвійний перегин смуги вбирання при 228 нм, 232 нм, який переходить у похиле плато в межах 232-238 нм, підсилений за рахунок поглинання анальбену та кофеїну та

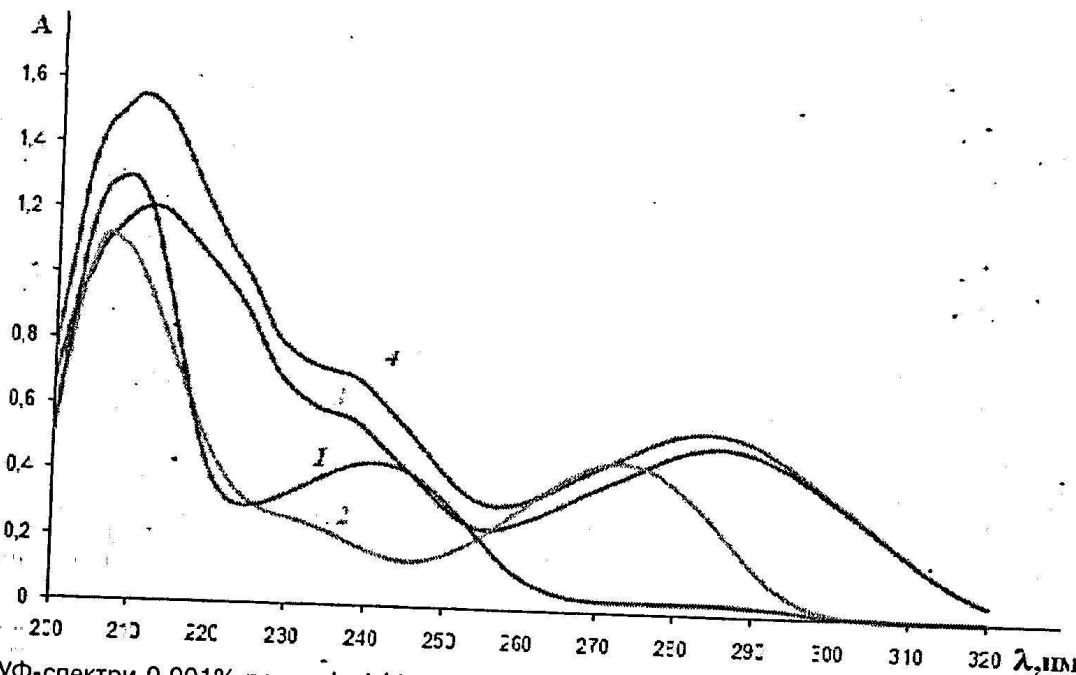


Рис. 1. УФ-спектри 0,001% розчинів АФІ та модельної суміші таблеток «Мігрепін» у 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої: 1 – анальбен; 2 – кофеїн; 3 – карбамазепін; 4 – модельна суміш.

широкий середньоінтенсивний максимум, дещо інтенсивніший та зміщений до 284 нм за рахунок накладання спектрів кофеїну та карбамазепіну.

Сумарний характер спектра, який залежить від наявності та кількості кожного з АФІ, є доволі специфічним за розташуванням та інтенсивністю максимумів і перегинів смуги вбирання. Відсутність або зміна кількості будь-якого з інгредієнтів призведе до зміщення максимумів смуги вбирання або зміни співвідношення інтенсивності максимумів. Зазначений факт дозволяє використати адсорбційну спектрофотометрію в УФ-ділянці для ідентифікації таблеток «Мігрепін». УФ-спектр розчину таблеток «Мігрепін» у 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої повинен мати два максимуми при 210 нм і 284 нм та подвійний перегин смуги вбирання в межах 228 – 238 нм. Відношення оптичної густини в максимумі при 210 нм до оптичної густини за довжини хвилі 236 нм має бути від 2,00 до 2,35. Відношення оптичної густини в максимумі за довжини хвилі 284 нм до оптичної густини за довжини хвилі 236 нм має бути від 0,70 до 0,86.

Для ідентифікації окремих компонентів таблеток «Мігрепін» ми рекомендуємо використовувати метод ТШХ. Нами було здійснено підбір системи розчинників, яка дозволила б розділити та підтвердити наявність усіх трьох АФІ. Оптимальною для цього виявилась рухома фаза, яка складається з хлороформу, спирту та гексану у співвідношенні 1:1:2. Випробування проводили на ТШХ пластинках, вкритих шаром силікагелю

GF₂₅₄. Детектування хроматограм проводили парами йоду. При хроматографуванні у цій системі кофеїн має R_f близько 0,36, карбамазепін – близько 0,59, анальбен – близько 0,80. На хроматограмі досліджуваного розчину спостерігалися три чітко розділені плями, які за розміром, забарвленням, його інтенсивністю та розташуванням відповідали плямам на хроматограмі розчинів порівняння стандартних зразків анальбену, кофеїну та карбамазепіну. Інших плям не спостерігалось.

Оскільки завдання полягало у ідентифікації окремих інгредієнтів трикомпонентного лікарського засобу, для підтвердження придатності хроматографічної системи ми перевіряли наявність трьох чітко розділених плям на хроматограмі суміші стандартних зразків анальбену, кофеїну та карбамазепіну. Таким чином, розроблений тест дозволяє ідентифікувати АФІ таблеток «Мігрепін» методом ТШХ.

Наявність окремих інгредієнтів досліджуваного препарату була підтверджена також специфічними хімічними реакціями. Оскільки анальбен, кофеїн та карбамазепін мають різну розчинність, для підвищення специфічності хімічні реакції проводили після попереднього вилучення компонентів з лікарської форми відповідними розчинниками. Паралельно проводили реакції з фармакопейно чистими субстанціями анальбену, кофеїну і карбамазепіну, які давали ті ж забарвлення.

Після вилучення вмісту таблеток сумішшю води і спирту у співвідношенні 1:1 розчин

фільтрували і розділяли на три частини. Першу частину випаровували досуха і доводили наявність кофеїну реакцією на ксантини. У другій частині визначали кофеїн за реакцією з розчином калію йодиду йодованого з наступним додаванням кислоти хлористоводневої розведеної – утворювався осад коричневого кольору.

Паралельно, для запобігання помилці, проводили реакцію з розчином карбамазепіну. Нами було встановлено, що карбамазепін в цих умовах реакції не дає.

У третій частині фільтрату наявність іону калію як складової частини анальбену доводили реакціями на калій з розчинами натрію кобальтнітриду або кислоти винної. У першому випадку утворювався жовтий осад, у другому – білий.

Карбоксильну групу в молекулі анальбену підтверджували після вилучення його із таблеткової маси 0,1 М розчином натрію гідроксиду дією солей важких металів за утворенням кольорових осадів: з розчином купруму (II) сульфату зеленувато-блакитного, з розчином феруму (III) хлориду – жовто-рожевого.

Карбамазепін підтверджували за утворенням

жовтого забарвлення спиртового витягу з розчином натрію нітриду у середовищі кислоти сульфатної концентрованої.

Таким чином, розроблений комплекс фізико-хімічних та хімічних методів ідентифікації дозволяє надійно підтвердити наявність усіх трьох АФІ у складі таблеток «Мігрепін».

Висновки. 1. Вивчено спектральні характеристики анальбену, кофеїну, карбамазепіну та модельної суміші таблеток «Мігрепін». Розроблено тест для ідентифікації препарату «Мігрепін» методом адсорбційної спектрофотометрії за розташуванням і співвідношенням інтенсивності максимумів та перегинів смуги вбирання.

2. Вивчено хроматографічну поведінку і підібрано систему розчинників, яка дозволяє розділити анальбен, кофеїн та карбамазепін на ТШХ пластинках, вкритих силікагелем GF₂₅₄. Розроблено методику перевірки наявності АФІ та придатності хроматографічної системи при ідентифікації таблеток «Мігрепін» методом ТШХ.

3. Підібрано специфічні розчинники та хімічні реакції для ідентифікації діючих компонентів таблеток «Мігрепін».

Література

1. Сирова Г. О. Изучение дозозависимых жаропонижающих свойств нового лекарственного средства / Г. О. Сирова // Український біофармацевтичний журнал. – 2009. – Т. 1, № 3 – С. 8–11.

2. Сирова Г. О. Експериментальне вивчення антиоксидантної ефективності нового комбінованого препарату з групи не стероїдних протизапальних лікарських засобів / Г. О. Сирова // Український біофармацевтичний журнал. – 2009. – Т. 1, № 2 – С. 30–33.

3. Влияние мигрепина на функциональную активность нейронов тригеминоцеребрального комплекса / А. Ю. Соколов, О. А. Любашина, С. С. Пантелеев [та ін.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. Прил. : Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам: 5-я межд. конф.: материалы конф. – Москва, 2010. – С. 81.

4. Звягінцева Т. В. Експериментальне вивчення специфічної дії «Мігрепіну» / Т. В. Звягінцева, Г. О. Сирова, Т. І. Єрмоленко // Фармаком. – 2009. – № 4. – С. 73–77.

5. Вивчення специфічної активності нової комбінації похідного 2,4-дихлорбензойної кислоти, кофеїну та карбамазепіну в експерименті / Т. В. Звягінцева, Л. Т. Киричок, Г. О. Сирова [та ін.] // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2008. – № 1. – С. 102-105.

6. Влияние мигрепина на активность нейронов каудального ядра тройничного нерва / А. Ю. Соколов, О. А. Любашина, Ю. Д. Игнатов [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2011. – Т. 74, № 5. – С. 13–16.

7. Левитин Е. Я. Опытнo-промышленный метод синтеза калиевой соли 2,4-дихлорбензойной кислоты / Е. Я. Левитин, В. А. Оридорога // Химико-фармацевтический журнал. – 2003. – № 12. – С. 28–29.

8. Розробка дослідно-промислового синтезу калієвої солі 2,4-дихлорбензойної кислоти / Е. Я. Левітін, В. О. Оридорога, В. Ф. Конев [та ін.] // Фармац. журн. – 2003. – № 3. – С. 66–69.

9. Сырoвая А.О. Экспериментальное подтверждение прогнозированной фармакологической активности калиевой соли 2,4-дихлорбензойной кислоты / А.О. Сырoвая // Фармаком. – 2010. – № 1. – С. 115-117.

10. Державна фармакопея України. / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-ше вид. – Доповнення 2. – Х. : Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – 620 с.

11. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-ше вид. – Харків : PIPEГ, 2001. – 556 с.

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ИДЕНТИФИКАЦИИ ДЕЙСТВУЮЩИХ ИНГРЕДИЕНТОВ
ОРИГИНАЛЬНОГО КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА – ТАБЛЕТОК
«МИГРЕПИН»**

Н. Ю. Бевз, Т. В. Звягинцева, А. О. Сыровая, В. А. Георгиянц, В. А. Грудько

Харьковский национальный медицинский университет, Харьков

Национальный фармацевтический университет, Харьков

Резюме: для идентификации действующих ингредиентов таблеток «Мигрепин» в соответствии требованиям ГФУ предложено использовать УФ-спектроскопию, тонкослойную хроматографию и химические реакции.

Ключевые слова: идентификация, анальбен, кофеин, карбамазепин.

**DEVELOPMENT OF TECHNIQUES FOR IDENTIFICATION OF THE ORIGINAL ACTIVE INGREDIENT
COMBINED DRUG – TABLETS “MIGREPIN”**

N. Yu. Bevz, T. V. Zvyahintseva, H. O. Syrova, V. A. Heorhiyants, V. O. Hrudko

Kharkiv National Medical University, Kharkiv

National Pharmaceutical University, Kharkiv

Summary: to identify the active ingredients of tablets “Migrepin” according to the requirements of HFC there was proposed to use the UV spectroscopy, thin layer chromatography and chemical reactions.

Key words: identification, analben, caffeine, carbamazepine.