

М. В. Ермакова, В. С. Березина, Л. И. Громова, Н. М. Петухова

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОЛИ N(4)-ПРОПИЛАЙМАЛИНА В РАСТВОРЕ В ПРИСУТСТВИИ ПРОДУКТОВ РАЗЛОЖЕНИЯ

Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия

Для изучения стабильности 1 % водного раствора соли N(4)-пропилаймалина (лабораторный код SR-1), являющейся перспективным антиаритмическим средством, необходимо выбрать специфичный в присутствии возможных продуктов разложения метод его количественного определения. Цель настоящей работы состояла в сравнительной оценке таких современных методов количественного определения, как спектрофотометрия, ВЭЖХ, денситометрия. Разработаны методики, которым дана метрологическая характеристика. Установлено, что спектрофотометрия не является специфичным методом и не может быть использована при изучении стабильности раствора SR-1. ВЭЖХ и денситометрия являются специфичными и пригодными для решения поставленной задачи.

Ряд исследований отечественных и зарубежных авторов показал, что четвертичные производные аймалина, алкалоида растений рода *Rauwolfia*, являются перспективными антиаритмическими средствами [1–3]. В Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии (СПХФА) уже длительное время проводятся исследования по созданию лекарственных форм на основе солей N(4)-пропилаймалина (СПА). В частности, разработан состав и технология производства таблеток N(4)-пропилаймалина бромидом, покрытых оболочкой [1]. Однако данное соединение практически нерастворимо в воде, что сильно ограничивает возможности создания инъекционной лекарственной формы на его основе. В СПХФА синтезирован ряд водорастворимых СПА с карбоновыми кислотами. Как установлено, наиболее перспективным для разработки парентерального препарата является соединение, получившее лабораторный код SR-1 [4].

Согласно литературным данным, аймалин и его производные неустойчивы в водных растворах [5, 6]. Поэтому одним из этапов разработки лекарственной формы SR-1 явилось изучение стабильности водного раствора. Основным критерием стабильности SR-1 в процессе хранения является его количественное содержание. Для определения количественного содержания SR-1 возможно использование спектрофотометрии (СФМ). Однако в присутствии возможных продуктов разложения необходимо разделение их и анализируемого компонента. Решить эту задачу позволяют хроматографические методы. Для анализа нелетучих соединений одним из наиболее применяемых современных хроматографических методов является ВЭЖХ. Кроме того, в настоящее время все большее распространение приобретает метод ТСХ-денситометрии (ДМ) [7]. Данный метод часто становится альтернативой ВЭЖХ в связи с относительной простотой выполнения анализа и низкой стоимостью расходных материалов [8].

Цель настоящей работы состояла в выборе специфичного метода и разработке точной и воспроизводимой методики количественного определения SR-1 в

1 % растворе, применимых для стандартизации инъекционной лекарственной формы. Для этого проведена сравнительная оценка методов СФМ, ВЭЖХ и ТСХ-денситометрии по их валидационным параметрам.

Экспериментальная часть

Субстанцию SR-1 получали по усовершенствованной трехстадийной схеме синтеза органических СПА [4].

Приготовленные водные растворы SR-1 в асептических условиях фильтровали через фильтр “Millipore” (США) с диаметром пор 0,22 мкм, разливали в ампулы из стекла марки НС-3 вместимостью 1 мл и запаивали. Полученные таким образом 1 % свежеприготовленные растворы использовали для определения точности и воспроизводимости методик.

Для определения специфичности методов использовали растворы, выдержанные в условиях “ускоренного старения” при температуре $(60 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 44 дней (соответствует 2 годам хранения при комнатной температуре) [9]. Определение количественного содержания SR-1 в растворах проводили через каждые 11 дней (соответствует 6 мес. хранения при комнатной температуре).

Валидационные параметры для сравнения методик принимали согласно рекомендациям проекта ОФС “Валидация фармакопейных методов” [10]. Также пользовались рекомендациями других источников по определению последовательности валидационных исследований [11]. Метрологические характеристики приведены в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи XI издания [12]. В качестве стандартного образца для количественных определений использовали субстанцию SR-1, соответствующую требованиям проекта фармакопейной статьи (РСО SR-1).

Спектрофотометрическое определение содержания SR-1 в растворах

2 мл исследуемого раствора помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили объем до метки

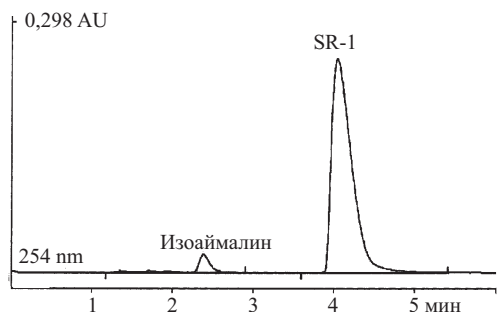


Рис. 1. ВЭЖХ-хроматограмма 1 % свежеприготовленного раствора SR-1

водой очищенной и перемешивали 2 мл приготовленного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили объем раствора до метки водой очищенной, перемешивали. Измеряли оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре СФ-46 (Россия) при длине волны 245 нм. Параллельно измеряли оптическую плотность раствора РСО SR-1. В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную.

Приготовление раствора РСО. Около 0,04 г SR-1 (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 25 мл воды очищенной, доводили объем водой до метки, перемешивали. 1 мл приготовленного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили объем раствора до метки водой очищенной, перемешивали.

Определение содержания SR-1 в растворах методом ВЭЖХ

1 мл исследуемого раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили до метки смесью ацетонитрил – бидистиллированная вода (1:1).

Приготовление калибровочных растворов. Около 1 г (точная навеска) РСО SR-1 помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 50 мл смеси ацетонитрил – бидистиллированная вода (1:1) и доводили до метки этой же смесью (10 мг/мл, исходный раствор). По 0,1; 0,2; 0,5; 0,75; 1; 1,2; 1,5; 2 и 5 мл исходного раствора помещали в мерные колбы вместимостью 100 мл и доводили до метки смесью ацетонитрил – бидистиллированная вода (1:1) (10, 20, 50, 75, 100, 120, 150, 200 и 500 мкг/мл соответственно, калибровочные растворы). По 1 и 5 мл раствора концен-

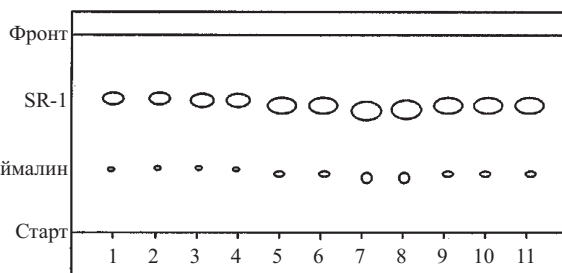


Рис. 2. ТС-хроматограмма, полученная для количественного определения SR-1 в 1 % свежеприготовленном растворе: калибровочная зависимость — точки 1 и 2; 3 и 4; 5 и 6; 7 и 8 (содержание 40; 48; 60; 72 мкг соответственно); исследуемый раствор — точки 9, 10, 11

трации 100 мкг/мл помещали в мерные колбы вместимостью 100 мл и доводили до метки смесью ацетонитрил – бидистиллированная вода (1:1) (1 и 5 мкг/мл соответственно, калибровочные растворы).

Калибровочные и исследуемые растворы фильтровали через фторопластовую мембрану МФФКГ-3 с диаметром пор 0,45 мкм (НПФ “Биохром“, Россия) и анализировали методом ВЭЖХ на микроколоночном хроматографе “Милихром-2А“ (Россия). Условия анализа: колонка Silasorb SPH 5 C18, элюент А — фосфатный буфер (рН 2,4 ± 0,2), элюент Б — ацетонитрил степени очистки “для ВЭЖХ“, режим элюирования изократический (40 % Б), температура колонки 35 °С, инъекция — 4 мкл, детектирование на 254 нм (постоянная времени 0,34 с).

Приготовление элюента А. 0,39 г водного натрия дигидрофосфата растворяли в 250 мл воды бидистиллированной и доводили 85 % фосфорной кислотой до рН 2,4 ± 0,2.

Количественный расчет содержания SR-1 в образцах проводили по методу внешнего стандарта (абсолютной градуировки) с помощью программного комплекса “МультиХром для Windows“ версия 3.1 (ЗАО “Амперсенд“, Россия).

Денситометрическое определение содержания SR-1 в растворах

2,0; 2,4; 3; 3,6 мкл свежеприготовленного 2 % раствора РСО SR-1 (40; 48; 60; 72 мкг) наносили в трех повторностях каждый на линию старта пластины Sorbfil UV 254 (Россия) размером 150 × 110 мм, рядом наносили 6 мкл исследуемого раствора SR-1 в трех повторностях. Пластины помещали в камеру со смесью растворителей хлороформ – ацетон – диэтиламин (15:12:3), предварительно насыщенную парами этих растворителей, и хроматографировали восходящим методом. Когда фронт растворителей проходил расстояние 9 см, пластину вынимали из камеры, сушили на воздухе в течение 10 мин. Проводили анализ полученной хроматограммы с использованием видеоденситометра для ТСХ ДенСкан-04 (Россия) при длине волны 254 нм. Количественный расчет содержания SR-1 в образцах проводили по методу внешнего стандарта

Таблица 1
Определение количественного содержания SR-1

Эквивалентный срок хранения, мес	Содержание SR-1 в растворе (мг/мл), определенное методом:		
	СФМ	ВЭЖХ	ДМ
0	10,00 ± 0,09	10,00 ± 0,10	10,00 ± 0,15
6	9,82 ± 0,11	8,72 ± 0,10	8,94 ± 0,18
12	9,94 ± 0,10	8,23 ± 0,09	8,45 ± 0,24
18	9,80 ± 0,14	7,27 ± 0,08	7,01 ± 0,29
24	9,87 ± 0,14	6,90 ± 0,09	6,40 ± 0,32

Метрологические характеристики методов анализа

Метод	μ	f	x_{cp}	s^2	s	$P, \%$	$t(P, f)$	$t_{выч}$	Δx_{cp}	ε	$F(P, f)$	$F_{выч}$
ВЭЖХ	10,00	8	10,13	0,04	0,19	95	2,3	2,05	0,14	1,38	6,03	5,00
ДМ	10,00	8	9,82	0,20	0,44	95	2,3	1,23	0,34	3,47		

(абсолютной калибровки) с помощью программы обработки хроматографических данных “Dens” (Россия).

Результаты и их обсуждение

Определение линейности, аналитической области СФМ, ВЭЖХ, денситометрической методик

УФ-спектр водного раствора SR-1 имеет два максимума поглощения при длинах волн 245 ± 2 и 290 ± 2 нм. В качестве аналитической выбрана длина волны 245 нм, при которой удельный показатель поглощения наибольший и составляет от 174 до 182. Как установлено, область подчинения закону Бугера – Ламберта – Бера находится в пределах концентраций от 10 до 60 мкг/мл. С учетом величины оптической плотности, при которой достигается наименьшая ошибка определения, и возможного уменьшения концентрации SR-1 в процессе хранения, аналитическая область выбрана в интервале 20 – 40 мкг/мл.

Для определения линейности метода ВЭЖХ построен график зависимости отклика детектора от концентрации SR-1. Установлено, что в исследованном интервале концентраций от 1 до 500 мкг/мл зависимость между данными величинами линейна (коэффициент корреляции 0,9996). Однако при концентрациях больше 200 мкг/мл и меньше 10 мкг/мл наблюдается увеличение ошибки определения. Аналитическая область выбрана в интервале 50 – 150 мкг/мл.

Для определения линейности метода ДМ построен график зависимости денситометрического сигнала от содержания SR-1 в пятне. В интервале концентраций от 15 до 220 мкг/мл наблюдается линейная зависимость между этими величинами (коэффициент корреляции 0,9867). При более высоких содержаниях происходит значительное изменение формы пятна SR-1 на пластине и отклонение от линейной зависимости. Более низкие, чем 15 мкг, концентрации лежат за пределом количественного определения метода. Аналитическая область методики выбрана в интервале от 40 до 80 мкг с учетом объема наносимого раствора и возможного изменения концентрации SR-1 в процессе хранения.

Определение специфичности методик

Проведено определение количественного содержания SR-1 в растворах, выдержанных в условиях “ускоренного старения”. Результаты приведены в табл. 1.

Установлено, что СФМ не является специфичным в присутствии продуктов разложения методом. Хроматографические методы позволяют разделять SR-1 и все посторонние примеси, присутствующие в растворе, проявляя хорошую селективность. Необходимо отметить, что методы ВЭЖХ и денситометрии специ-

фичны также и в отношении регламентируемой примеси аймалина, присутствующей в субстанции в допустимом, около 2 %, количестве (проект ФСП на субстанцию SR-1) (рис. 1, 2).

Сравнительная оценка методов ВЭЖХ и денситометрии

Нами также проводилась оценка применения методов по показателям точность и воспроизводимость. Точность методик установлена по результатам определения количественного содержания для трех партий раствора и составляет $99,10 \pm 0,55 \%$ и $98,60 \pm 0,79 \%$ для ВЭЖХ и денситометрии соответственно. Результаты оценки воспроизводимости методик приведены в табл. 2.

Сравнение вычисленного значения критерия Стьюдента ($t_{выч}$) с табличным ($t(P, f)$) показало отсутствие систематической ошибки в результатах анализа, полученных данными методами (табл. 2).

Сравнение рассчитанных ($F_{выч}$) и табличных ($F(P, f)$) значений критерия Фишера показало, что различие дисперсий двух рассмотренных методов не является статистически значимым (табл. 2). Следовательно, нельзя достоверно сделать заключение о более высокой воспроизводимости ВЭЖХ по сравнению с ДМ. Метод ДМ может служить альтернативным способом количественного определения, так как является более простым, быстрым и доступным.

Таким образом, разработаны две специфичные методики количественного определения SR-1, которые могут быть как использованы как для изучения стабильности растворов SR-1, так и включены в нормативную документацию на инъекционный раствор. Нужно отметить, что в случае варьирования факторов, влияющих на стабильность раствора (например, pH, введение в состав вспомогательных веществ) специфичность методик следует подтвердить.

ЛИТЕРАТУРА

1. С. А. Минина, Я. В. Костин, Э. И. Генденштейн и др., *Хим.-фарм. журн.*, **21**(5), 559 – 561 (1987).
2. С. А. Минина, Я. В. Костин, Е. М. Сергеева и др., *Хим.-фарм. журн.*, **28**(3), 16 – 19 (1994).
3. J. Keck, *Z. Naturforsch.*, **18**(3), 177 – 179 (1963).
4. Р. В. Шебатин, Д. П. Севбо, Е. Е. Лесиовская, *Хим.-фарм. журн.*, **36**(4), 16 – 18 (2002).
5. С. А. Минина, Е. И. Молохова, Т. В. Астахова и др., *Сборник научных трудов ВНИИФ: “Технологические аспекты создания лекарственных форм”*, Москва (1986), сс. 166 – 170.
6. Е. М. Сергеева, *Автореф. дис. канд. фарм. наук*, Санкт-Петербург (1993).
7. K. Ferenczi-Fodor, Z. Végh, A. Nagy-Turak, et al., *J. AOAC Int.*, **84**(4), 1265 – 1276 (1999).

8. В. Д. Красиков, *Журн. аналит. хим.*, **58**(8), 792 – 807 (2003).
9. *Временная инструкция по проведению работ с целью определения сроков годности лекарственных средств на основе метода “ускоренного старения” при повышенной температуре*, Москва (1983), сс. 1 – 10.
10. Проект ОФС “Валидация фармакопейных методов”, Ведомости научного центра экспертизы и государственного контроля лекарственных средств, **5**(1), 28 – 29 (2001).
11. П. Носырев, М. Носырева, Т. Рассказова и др., *Ремедиум*, № 11, 62 – 64 (2003).
12. *Государственная фармакопея СССР: Вып. 2*, 11 изд. доп., Медицина, Москва (1989), сс. 199 – 221.

Поступила 24.05.04

DEVELOPMENT OF QUANTITATIVE METHODS OF DETERMINATION OF SALT OF N(4)-PROPYLAJMALIN IN A SOLUTION IN THE PRESENCE OF ITS DEGRADATION PRODUCTS

M. V. Ermakova, V. S. Berezina, L. I. Gromova, N. M. Petukhova

Saint-Peterburg state chemical-pharmaceutical academy, Saint-Peterburg

To study of the stability of an aqueous N(4)-propylajmaline salt (code SR-1) solution, which is a promising antiarrhythmic agent, it is necessary to choose and develop a method of quantitative determination of SR-1 in the presence of its degradation products. The aim of this work is to perform a comparative analysis of different methods of quantitative determination: spectrophotometry, HPLC, densitometry. It is found, that spectrophotometry is not a specific method and should not be used in the study of the stability of the SR-1 solution. HPLC and densitometry are specific and applicable procedures.