

## Розробка методики кількісного визначення діючих речовин у складі комбінованих супозиторіїв

Н.А.Кондратюк, В.А.Ханін, В.О.Грудько, Д.І.Дмитрієвський

Національний фармацевтичний університет, кафедра заводської технології ліків  
Харків, Україна

На основі методу високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) розроблено раціональну методику кількісного визначення сукцифенату, бензокаїну та діакаμφу у складі комбінованих супозиторіїв при їх спільній присутності у одному препараті. Стандартизовано умови проведення хроматографічного аналізу, які забезпечують повне розділення діючих речовин. Встановлені вимоги до тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи».

**Ключові слова:** супозиторії, кількісне визначення, сукцифенат, діакаμφ, бензокаїн.

### ВСТУП

Завдяки прогресу новітніх технологій та високому науковому потенціалу вітчизняних науковців, сучасний розвиток фармацевтичної галузі України набирає все більше обертів. В галузі медицини та фармації ведуться чисельні розробки оригінальних лікарських засобів різноспрямованої дії, серед яких особливу увагу привертають комбіновані препарати, які мають вагомі переваги порівняно з однокомпонентними. Поєднуючи активні речовини з різною фармакологічною дією в одній лікарській формі, вони забезпечують комплексність дії, високу ефективність, зручність застосування і доступність для широкого кола хворих.

Одним із напрямків медицини, де комбінованим лікарським засобам приділяється найбільша увага, є проктологія. Проктологічні захворювання (геморой, анальна тріщина, проктит тощо) характеризуються складною симптоматикою (біль, спазм, кровотеча, запальний процес, пошкодження слизової оболонки та ін.), тому вони потребують застосування лі-

карських речовин з різною фармакологічною дією: місцевоанестезувальною, гемостатичною, репаративною, протизапальною та ін. [7-8].

Враховуючи складну картину клінічних проявів захворювань прямої кишки, на кафедрі заводської технології ліків НФаУ розроблено новий комбінований лікарський засіб у формі супозиторіїв. До його складу входять гемостатик (сукцифенат) – натрієва сіль 4-ацетилсукцинанілової кислоти, речовина з репаративною та протизапальною активністю (діакаμφ) – (±)-цис-3-(2'-бензімідазоліл)-1,2,2-триметилциклопентанкар-бонова кислота, а також місцевий анестетик бензокаїн (анестезин) – етиловий ефір п-амінобензойної кислоти. Як основа використаний сплав проксанолу-268 з поліетиленоксидом-400 та пропіленгліколем. Така комбінація активних речовин діє на основні ланки захворювань: усуває кровотечі, зменшує біль, сприяє зменшенню запальних процесів та прискорює репаративні процеси в ушкоджених ділянках прямої кишки.

Комбінування декількох речовин дозволяє зробити лікарські засоби набагато ефективнішими, але одночасно значно ускладнює процес їх стандартизації. Для таких препаратів досить часто неможливо застосовувати традиційні методи контролю (титриметрію, фотометрію та ін.).

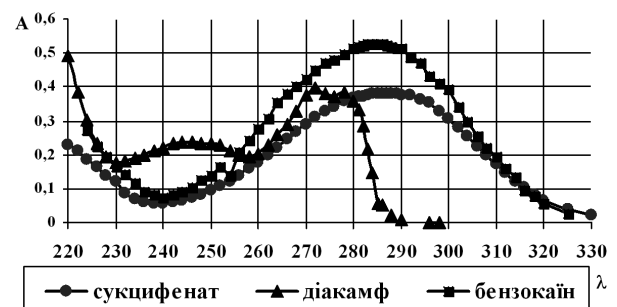


Рис. 1. Адсорбційні спектри розчинів сукцифенату, діакаμφу та бензокаїну.

Так, в нашому випадку проведена спроба використання спектрофотометричного методу в ультрафіолетовій ділянці спектру для кількісного визначення діючих речовин у складі розробленого препарату. Було досліджено адсорбційні спектри активних інгредієнтів в межах від 220 до 330 нм. Результати наведені на рис. 1.

Як видно з рис. 1, УФ — спектр сукцифенату в аналізованій області — складається з широкої інтенсивної смуги поглинання з максимумом при 287 нм. Спектр поглинання бензокаїну містить різку низькоінтенсивну смугу бензольного типу при 252 нм і широку, високоінтенсивну смугу з максимумом при 285 нм. Адсорбційний спектр діакаамфу представлений трьома смугами вбирання — низькоінтенсивною короткохвильовою з максимумом при 244 нм та двома інтегрованими смугами з максимумами при 272 та 278 нм. Враховуючи, що смуги вбирання всіх трьох компонентів перекриваються (у суміші відбувається їх накладання), проведення кількісного визначення препарату, який містить одночасно такі діючі речовини, спектрофотометричним методом неможливо.

Для вирішення цієї проблеми доцільно застосовувати нові, більш сучасні методи аналізу, зокрема високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ) [2, 6].

ВЕРХ — це високочутливий, універсальний, автоматизований метод, який має високу ефективність розділення, що дозволяє досліджувати складні суміші багатьох компонентів з отриманням надійних результатів за короткий проміжок часу [1, 4, 5].

Метою даної роботи є розробка методу контролю якості комбінованих супозиторіїв, виготовлених на проксаноловій основі, до складу яких включені такі речовини: сукцифенат (натрієва сіль 4-ацетилсукциніланілової кислоти), діакаамф ((±)-цис-3-(2'-бензімідазоліл)-1,2,2-триметилциклопентанкарбонова кислота), а також бензокаїн (етилловий ефір п-амінобензойної кислоти).

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проводилися на хроматографі НР 1100 спорядженому детектором діодною матрицею, що дозволило контролювати ступінь розділення речовин і частоту піків аналізованих сполук. Наявність у системі 4-х каналного насоса забезпечувала широкі можливості при створенні градієнта низького тиску та збільшувало розділювальну здатність системи.

Для виконання вимірювань використовували колонку Atlantis dC18 (Waters corp.) розміром 250×4,6 мм, заповнену сорбентом із привитою фазою октадецилсілікагель, із розміром частинок 5 мкм. Згідно даних виробника, сорбент цієї колонки відповідає типу L1 за класифікацією ДФУ [2].

При розробці кількісного визначення препарату, який одночасно містив сукцифенат, бензокаїн та діакаамф, необхідно було підібрати методику ВЕРХ, при якій би відбулося повне розділення діючих речовин.

Для цього було використано градієнтну методику ВЕРХ, що дозволило не лише розділити аналізовані речовини, але й забезпечити метрологічні характеристики, які повністю відповідають вимогам ДФУ до методики кількісного визначення.

Хроматограф, який використовувався при дослідженні, був обладнаний автоматичним пристроєм введення проб. Кількісне визначення діючих речовин проводили методом абсолютного калібрування, для чого необхідно було розробити методику приготування досліджуваного розчину та розчину порівняння.

Умови проведення пробопідготовки та кількісного визначення наведені нижче:

Приготування досліджуваного розчину. 3 супозиторії (середня маса супозиторія 3,0 г) поміщають у мірну колбу місткістю 500 мл, доводять об'єм розчину розчинником до мітки, оброблюють протягом 10 хв. на ультразвуковій (УЗ) бані, охолоджують і 10 хв. перемішують на магнітній мішалці, фільтрують через скляний фільтр ПОР16.

Приготування розчину сумарного СЗ. 0,075 г (точна наважка) СЗ діакаамфу, 0,06 (точна наважка) СЗ сукцифенату, 0,06 (точна наважка) СЗ бензокаїну поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, додають 50 мл розчинника і оброблюють на УЗ бані протягом 10 хв. Потім отриманий розчин охолоджують, доводять розчинником до мітки і оброблюють на УЗ бані протягом 10 хв. Отриманий розчин перемішують і фільтрують через фільтр ПОР16. Розчин є придатним протягом 7 діб при зберіганні в темному прохолодному місці.

Приготування розчинника. 600 мл ацетонітрилу Р1, 200 мл метанолу Р2, поміщають у мірну колбу місткістю 1000 мл, доводять водою до мітки і перемішують.

Приготування буферного розчину рН 3,0. 21,0 г перхлорату літію поміщають в стакан місткістю 1000 мл, додають 800 мл води, перемішують і потенціометрично титрують ортофосфор-

ТАБЛИЦЯ 1

Схема елюювання

Час, хв	Вміст РФ А, %	Вміст РФ Б, %	Режим елюювання
0	90	10	ізократичний
5	90	10	ізократичний
30	60	40	лінійний градієнт
40	60	40	ізократичний
45	90	10	лінійний градієнт
55	90	10	ізократичний

ною кислотою до рН 3,0. Отриманий розчин поміщають у мірну колбу місткістю 1000 мл доводять водою до мітки. Розчин перемішують.

Умови хроматографування: колонка Atlantis dC18 (Waters corp.), розміром 250×4,6 мм, заповнена сорбентом із прищепленою фазою октадецилсілікагель з розміром частинок 5 мкм; рухома фаза А: буферний розчин із рН 3,0, дегазований будь-яким зручним способом; рухома фаза Б: ацетонітрил, дегазований будь-яким зручним способом; режим елюювання — градієнтний; довжина хвилі 280 нм; швидкість потоку 0,8 мл/хв.; об'єм інжекції 5 мкл; температура термостату колонки 30° С.

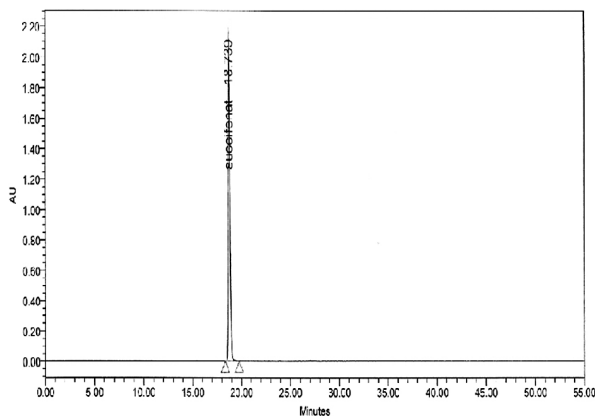


Рис. 1. Хроматограма стандартного зразка сукцифенату.

ТАБЛИЦЯ 2

Відносні стандартні відхилення

$n_0$	2	3	4	5	6
RSD (%) <					
Для допуску вмісту ±10%	0,51	1,34	1,92	2,37	2,75

Схема елюювання наведена в табл. 1.

Для розрахунку відносного стандартного відхилення (RSD), яке порівнюється з табличними значеннями, хроматографують розчин сумарного СЗ, отримуючи від 2 до 6 хроматограм [3].

Отримання паралельних хроматограм ( $n_0$ ) припиняли при досягненні вимог до RSD, що зазначені нижче в табл. 2.

Поперемінно хроматографували досліджуваний розчин і розчин порівняння, отримуючи число паралельних хроматограм ( $n$ ) для кожного з розчинів не менше, ніж при перевірці придатності хроматографічної системи за наведеними вище хроматографічними умовами.

Оскільки ми використовували метод абсолютного калібрування із застосуванням зовнішнього СЗ, вміст сукцифенату, бензокаїну або діакаμφу (X) в одному супозиторії у грамах розраховували за формулою:  $x = (S \times m_0 \times 500 \times P)$

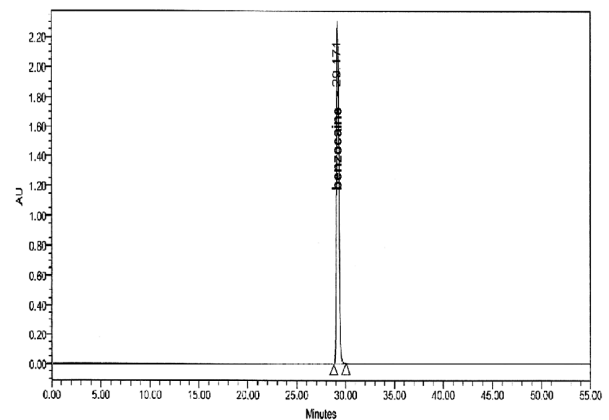


Рис. 2. Хроматограма стандартного зразка бензокаїну.

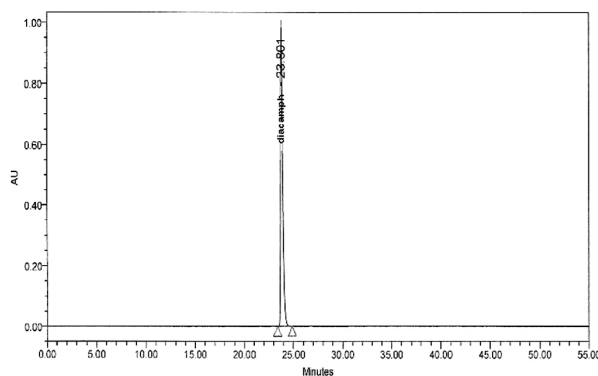


Рис. 3. Хроматограма стандартного зразка діакаμφу.

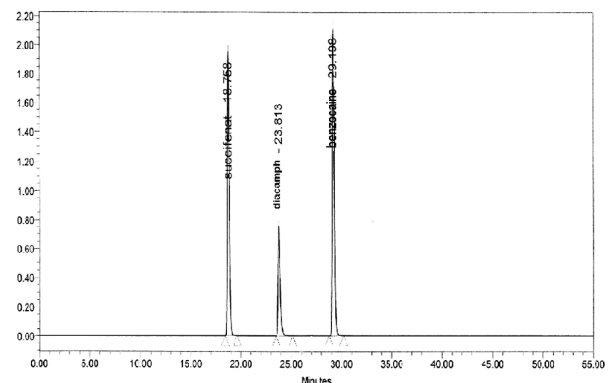


Рис.4. Хроматограма розчину досліджуваного препарату.

ТАБЛИЦЯ 3

## Метрологічні характеристики методики кількісного визначення

$X_i$	f	X	$S^2$	$S_x$	P, %	t(p, f)	$\Delta X_{cp}$	$\varepsilon_{cp}, \%$
<b>Сукцифенат</b>								
0,098 0,100 0,097 0,103 0,101 0,102	5	0,100	$5,37 \times 10^{-6}$	$9,46 \times 10^{-4}$	95	2,57	$9,93 \times 10^{-4}$	$\pm 2,43$
<b>Бензокаїн</b>								
0,100 0,098 0,099 0,105 0,101 0,102	5	0,101	$6,17 \times 10^{-6}$	$1,01 \times 10^{-3}$	95	2,57	$1,06 \times 10^{-3}$	$\pm 2,58$
<b>Діакамф</b>								
0,127 0,123 0,128 0,125 0,131 0,129	5	0,127	$8,17 \times 10^{-6}$	$1,17 \times 10^{-3}$	95	2,57	$1,22 \times 10^{-3}$	$\pm 2,36$

/ ( $S_0 \times 3 \times 100 \times 100$ ), де  $S_i$  — середнє значення площі піка сукцифенату, бензокаїну або діакамфу, обчислене із хроматограм досліджуваного розчину препарату;  $S_0$  — середнє значення площі піку сукцифенату, бензокаїну або діакамфу, обчислене з хроматограм розчину сумарного СЗ;  $m_0$  — маса наважки сукцифенату, бензокаїну або діакамфу в сумарному СЗ, в грамах;  $P$  — вміст основної речовини в сукцифенаті, бензокаїні або діакамфі, що була взята для приготування сумарного СЗ, у відсотках.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ідентифікація хроматографічних піків проводилася стандартним методом додавань і за характерними для кожної речовини спектральними співвідношеннями.

На рис. 1-3 наведено хроматограми стандартних зразків сукцифенату, бензокаїну, діакамфу відповідно. На рис. 4 зображено хроматограму розчину досліджуваного препарату. Усі хроматограми одержано за зазначених вище умов.

Проведені дослідження свідчать, що час утримання хроматографічних піків окремих діючих речовин збігається з часом утримання піків у досліджуваному препараті. Порядок виходу піків діючих речовин на хроматограмах досліджуваних речовин був таким: 1-ий пік (сукцифенат) — 18,758 хв., 2-ий пік (діакамф) — 23,813 хв., 3-й пік (бензокаїн) — 29,198 хв. Як бачимо з рис. 4, у зазначених умовах відбувається

повне розділення усіх речовин, що підтверджує можливість проведення кількісного визначення сукцифенату, бензокаїну та діакамфу при їх спільній присутності в одному препараті.

Оскільки компоненти, які входять до складу основи активно не поглинають УФ-світло при обраній довжині хвилі 280 нм, вони не можуть впливати на результати кількісного визначення.

Методику було апробовано на вплив різних факторів, таких як колонки різних виробників (Symmetry C18 250×4,6 мкм, Eclipse XDB18 250×4,6 мкм), швидкість потоку, склад рухомої фази та температура термостату колонки. Встановлено, що вплив цих факторів є незначущим та не впливає на результати, отримані за цією методикою.

Метрологічні характеристики хроматографічної методики кількісного визначення наведено в табл. 3.

Для стандартизації умов кількісного визначення до методики введено розділ «Придатність хроматографічної системи», що містить наведені нижче вимоги до аналітичної системи:

- ефективність хроматографічної колонки, розрахована для сукцифенату, бензокаїну або діакамфу на хроматограмі сумарного СЗ, (не менше 1000 теоретичних тарілок) [2];

- коефіцієнт розділення піків отриманих на хроматограмі розчину сумарного СЗ (не менше 2);

- коефіцієнт асиметрії піка, розрахований за піком сукцифенату, бензокаїну або діакамфу із хроматограм розчину сумарного СЗ, (не більше 2,5) [2].



Нормування вмісту речовин, що визначалися, по відношенню до їх номінального вмісту у препараті, запропоновано проводити у діапазоні  $\pm 10\%$ . Підставою для цього стали вимоги ДФУ до нормування вмісту активних речовин у ГЛЗ [2].

Таким чином, вміст сукцифенату у одному супозиторії повинен бути від 0,09 г до 0,11 г, бензокаїну від 0,09 г до 0,11 г, діакамфу від 0,1125 г до 0,1375 г у перерахунку на середню масу супозиторія.

Результати визначення вмісту діючих речовин вважаються достовірними, якщо виконуються такі вимоги проведення дослідження:

– необхідно використовувати стандартні зразки, які атестовані Фармакопейним центром МОЗ України, що враховано у формулі розрахунку (на даний час проводиться атестація стандартних зразків, яка буде закінчена до впровадження препарату у промислове виробництво);

– необхідно дотримуватися вимог тесту «Придатність хроматографічної системи».

## ВИСНОВКИ

1. Розроблено аналітичну методику кількісного визначення діючих речовин, які входять до складу комбінованих супозиторіїв для лікування проктологічних захворювань.

2. Стандартизовано умови проведення хроматографічного аналізу (ВЕРХ), які забезпечують повне розділення сукцифенату, бензокаїну та діакамфу при їх спільній присутності у препараті.

3. Встановлено вимоги до тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи».

4. Статистична обробка результатів експерименту свідчить, що відносна невизначеність середнього результату знаходиться у допустимих межах.

5. Розроблена методика аналізу буде використана при створенні АНД на комбіновані супозиторії.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Гризодуб А.И. Метрологические аспекты официальных методик контроля качества лекарственных средств. 1. Методики ВЭЖХ / А.И.Гризодуб, Д.А.Леонтьев, М.Г.Левин // Физиологично-активні речовини. — 2001. — №1 (31). — С. 32-44.
2. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: РІРЕГ, 2001. — 556 с.
3. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопей-

ний центр». — 1-е вид. — Доп. 2. — Харків: РІРЕГ, 2008. — 620 с.

4. Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии для анализа многокомпонентных лекарственных препаратов / А.В.Костарной, Г.Б.Голубицкий, Е.М.Басова и др. // Журнал аналитической химии. — 2008. — Т. 63, №6. — С. 566-580.
5. Кухтенко О.С. Розробка методу кількісного аналізу діючих речовин супозиторіїв «Проктопантезин» / О.С.Кухтенко, В.А.Ханін, В.О.Грудько // Фармацевтичний журнал. — 2006. — №6. — С. 65-68.
6. Column high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of rosiglitazone and metformin in a pharmaceutical preparation / A.R.Ali, I.I.Duraiddi, M.M.Saket, E.S.Abu-Nameh // J. AOAC Int. — 2009. — Vol. 92, №1. — P. 119-124.
7. Pigot F. Haemorrhoidal disease / F.Pigot // Rev Prat. — 2008. — Vol. 58, №16. — P. 1763-1768.
8. Hemorrhoids — diagnosis and treatment options / D.Smud, T.Kekez, M.Majerović et al. // Lijec Vjesn. — 2005. — Vol. 127, №5-6. — P. 129-133.

**Н.А.Кондратюк, В.А.Ханін, В.А.Грудько, Д.И.Дмитриевский. Разработка методики количественного определения действующих веществ в составе комбинированных суппозиторий. Харьков, Украина.**

**Ключевые слова:** суппозитории, количественное определение, сукцифенат, диакамф, бензокаин.

На основании метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) разработана рациональная методика количественного определения сукцифената, бензокаина и диакамфа в составе комбинированных суппозиторий при их совместном присутствии в одном препарате. Стандартизованы условия проведения хроматографического анализа, которые обеспечивают полное разделение действующих веществ. Установлены требования к тесту «Проверка пригодности хроматографической системы».

**N.A.Kondratyuk, V.A.Hanin, V.A.Grudko, D.I.Dmitrievskiy. Quantitative determination of active ingredients in composition of combined suppositories. Kharkiv, Ukraine.**

**Key words:** suppositories, quantitative determination, succiphenate, benzocaine diacamph.

The rational method of quantitative determination of succiphenate, benzocaine and diacamph presented in combined suppository at the same time was developed on the base of high-performance liquid chromatographic (HPLC) method.

The conditions of chromatographically analyses providing full separation of active ingredients were standardized. Requirements for test «Control of valid of chromatographical system» were established.

Надійшла до редакції 2.06.2009 р.