

Л.І. Кучеренко¹, В.В. Ващенко², З.Б. Моряк¹, О.О. Портна¹, Л.І. Шаповалова², М.О. Авраменко¹,
Н.В. Парнюк¹, О.В. Хромильова¹, К.П. Шабельник¹

Оптимізація методики визначення технологічних домішок у субстанції Тіотріазоліну

¹Запорізький державний медичний університет,

²НПО «Фарматрон», м. Запоріжжя,

НТК «Інститут монокристалів» НАН України», м. Харків

Ключові слова: Тіотріазолін, технологічні домішки, хроматографія.

У зв'язку з тим, що велику увагу нині приділяють новим фізико-хімічним методам досліджень лікарських засобів, зокрема високоефективній рідинній хроматографії, опрацьовано як уже існуючі методики визначення технологічних домішок у субстанції Тіотріазоліну, так і новий метод визначення зазначених домішок – метод високоефективної рідинної хроматографії, для якого розроблено методику визначення. Розроблену методику запропоновано для введення до методик контролю якості лікарських засобів заводу-виробнику, вона буде введена до методики контролю якості при перереєстрації субстанції Тіотріазоліну.

Оптимизация методики определения технологических примесей в субстанции Тиотриазолина

Л.И. Кучеренко, В.В. Ващенко, З.Б. Моряк, Е.А. Портная, Л.И. Шаповалова, Н.А. Авраменко, Н.В. Парнюк, О.В. Хромилева, К.П. Шабельник

В связи с тем, что на сегодняшний день большое внимание уделяют физико-химическим методам исследования лекарственных средств, а именно высокоэффективной жидкостной хроматографии, проработаны как уже существующие методики определения технологических примесей в субстанции Тиотриазолина, так и новый метод определения упомянутых примесей – метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, для которого разработана методика определения. Разработанная методика предложена для внесения в методики контроля качества лекарственных средств заводу-производителю и будет внесена в методику контроля качества при перерегистрации субстанции Тиотриазолина.

Ключевые слова: Тиотриазолін, технологические примеси, хроматография.

Optimization of method of technological admixtures determination in thiotriazolin substance

L.I. Kucherenko, V.V. Vashchenko, Z.B. Moryak, E.A. Portnaya, L.I. Shapovalova, N.A. Avramenko, N.V. Parnyuk, O.V. Khromileva

Taking into consideration that nowadays great attention is paid to the physical and chemical methods of medications analysis, namely – to the high-efficiency liquid chromatography, we worked through present methods of determination of technological admixtures in Thiotriazolin substance and worked out new method of determination of above mentioned admixtures – method of high-efficiency liquid chromatography, for which the methodology of determination was developed. The method developed by us is offered to the factory-producer for entering in the medications quality control methods and will be included in it during re-registering of Thiotriazolin substance.

Key words: Thiotriazolin, technological admixture, chromatography.

Розробка і створення високоефективних і безпечних лікарських засобів є актуальним питанням сучасної фармації і медицини [1]. Відкриттями останніх десятиліть встановлено, що більшість поширених захворювань людини, які зменшують тривалість життя і знижують її соціальну активність, особливо патологія серцево-судинної системи, дихальних шляхів, нейродегенеративні захворювання, злоякісні новоутворення, у патогенезі мають чітко виражену вільнорадикальну фазу [5,6]. Саме тому широкого застосування набув Тіотріазолін. Цей препарат належить одразу до двох фармакологічних груп: антиоксидантів (ті, що поліпшують дихання тканин та обмін речовин у них) та гепатопротекторів (захищають клітини печінки). Цей лікарський засіб проявляє протизапальну і протівірусну дію, сприяє підвищенню тону судин, поліпшенню окислювально-відновних процесів у тканинах, стимуляції великої захисної системи, проявляє імунomodulatory ефект [7]. Тіотріазолін має здатність запобігати пошкодженню гепатоцитів і стимулювати їх здатність до відновлення [7,8]. У серцевому м'язі препарат гальмує окислення, перешкоджає розвитку некрозу. Паралельно поліпшується

плинність крові, що полегшує обмін речовин у тканинах. Застосовують Тіотріазолін також у складі комплексної терапії захворювань серця: інфарктів міокарда, постінфарктного кардіосклерозу, порушень серцевого ритму, стенокардії напруження і спокою [12]. Промисловість України випускає нині різноманітні лікарські форми як Тіотріазоліну, так і його фіксованих комбінацій [11]. Тому велику цікавість становить розробка нових методик аналізу Тіотріазоліну [14].

Мета роботи

Розробка методики визначення технологічних домішок у субстанції Тіотріазоліну методом високоефективної рідинної хроматографії.

Матеріали і методи дослідження

Велику увагу нині приділяють новим фізико-хімічним методам досліджень лікарських засобів, високоефективній рідинній хроматографії [10]. Опрацьовали як уже існуючі методики визначення технологічних домішок (технологічні домішки – це напівпродукти синтезу і побічні продукти. Ці домішки є специфічними для кожної субстанції і залежать від технологічного процесу) в

субстанції Тіотриазоліну (метод тонкошарової хроматографії), так і розроблено новий метод визначення зазначених домішок (високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ)) [2,3,4].

Результати та їх обговорення

Завод-виробник проводить визначення технологічних домішок у субстанції Тіотриазоліну методом тонкошарової хроматографії згідно до вимог Державної фармакопеї України (ДФУ, 1.2, 2.2.27) [3,4,13,14]. Технологічними домішками в субстанції Тіотриазолін є ацетилтіосемікарбазид, тіосемікарбазид та 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіон. Для здійснення досліджень використано 5 серій субстанції Тіотриазоліну, надані заводом-виробником та НВО «Фарматрон», зокрема 511211, 471211, 100112, 660312, 670312.

Опрацьовано діючу методику, включену в існуючі методики контролю якості (МКЯ) на субстанцію Тіотриазолін. Дослідження проводили з використанням наданих для порівняння фармакопейних стандартних зразків (ФСЗ). Крім того, розробили методику якісного та кількісного визначення технологічних домішок методом ВЕРХ, дослідження здійснено спільно з фахівцями ДП «Завод хімічних реактивів» НТК «Інститут монокристалів» НАН України».

Методика

Випробуваний розчин. 0,100 г субстанції поміщають у мірну колбу місткістю 10,0 мл, розчиняють у 6 мл 96% спирту, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до мітки і перемішують.

Розчин порівняння (а). 0,010 г ФСЗ 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіону поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняють у 80 мл 96% спирту, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до мітки і перемішують.

25 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу

місткістю 50,0 мл, доводять об'єм розчину 96% спиртом до мітки і перемішують.

Розчин використовують одразу після приготування.

Розчин порівняння (б). 0,010 г ФСЗ ацетилтіосемікарбазиду поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняють у 80 мл 96% спирту Р, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до мітки і перемішують.

25 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу місткістю 50,0 мл, доводять об'єм розчину 96% спиртом Р до мітки і перемішують.

Розчин використовують одразу після приготування.

На лінію старту хроматографічної пластинки «Сорбфіл ПТСХ-АФ-В», розміром 10X15 см наносять 10 мкл (100 мкг) випробуваного розчину, 10 мкл (0,5 мкг) розчину порівняння (а), 10 мкл (0,5 мкг) розчину порівняння (б) та в одну точку наносять 10 мкл (100 мкг) випробуваного розчину, 10 мкл (0,5 мкг) розчину порівняння (а) і 10 мкл (0,5 мкг) розчину порівняння (б) (суміш для перевірки придатності хроматографічної системи). Пластинку сушать на повітрі протягом 5 хв, потім поміщають у камеру із сумішшю розчинників вода Р – ацетон Р (2:50) та хроматографують висхідним способом. Коли фронт розчинників пройде близько 12 см від лінії старту, пластинку виймають з камери, сушать на повітрі протягом 15 хв і поміщають на 10 хв до йодної камери.

На хроматограмі випробуваного розчину, крім основної плями на старті, допускається наявність додаткових плям, розташованих на рівні плям на хроматографі розчину порівняння (а) та розчину порівняння (б) і не перевищуючих їх за величиною та інтенсивністю забарвлення (не більше 0,5% 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіону і не більше 0,5% ацетилтіосемікарбазиду).

Результати аналізу вважали вірогідними, бо виконувались вимоги тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи»: на хроматограмі суміші для перевірки придатності хроматографічної системи виявлені плями чітко діляться. Результати аналізу подано на *рис. 1*.

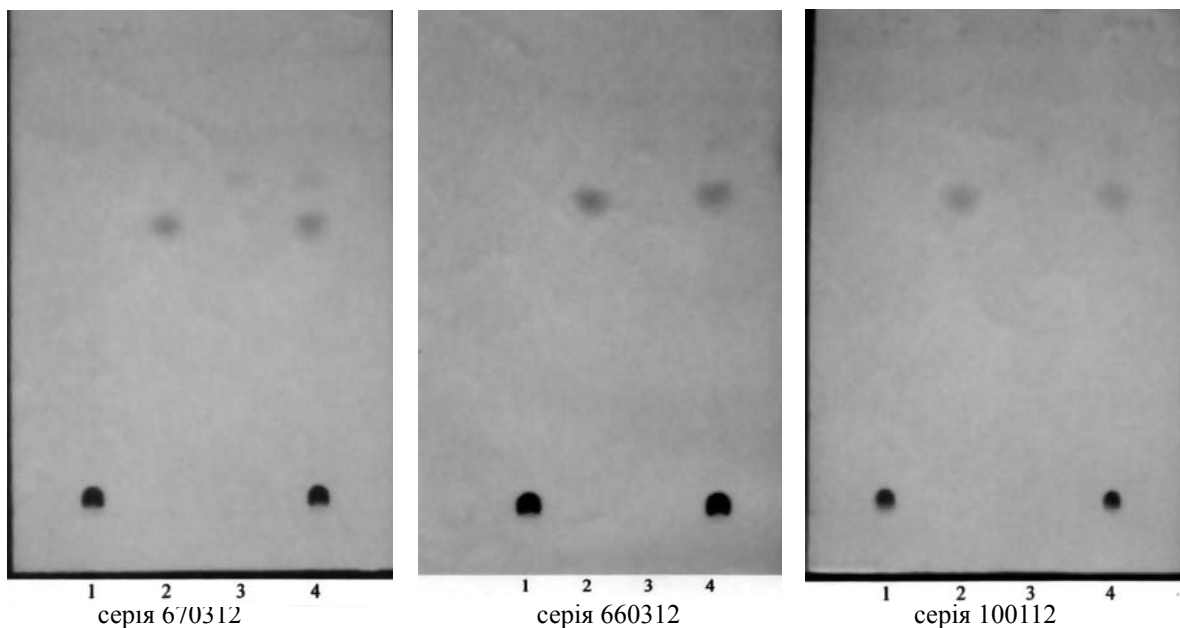


Рис. 1. Визначення технологічних домішок у досліджуваних серіях Тіотриазоліну.

Примітка: 1. Тіотриазолін; 2. Ацетилтіосемікарбазид; 3. 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіон; 4. Придатність хроматографічної системи.

Треба зауважити, що зазначена методика визначення технологічних домішок у субстанції Тіотріазоліну методом ТШХ має наступні недоліки:

- обмежена розподільна здатність через порівняно невелику довжину розподільної зони;
- велика похибка при кількісних визначеннях, зумовлена суб'єктивними факторами;
- мала вибірковість;
- велика залежність кількісного результату від умов дослідження: відносної вологості, температури, а також наявності забруднюючих речовин у повітрі.

Також метод ТШХ не дозволяє визначати не ідентифіковані домішки в субстанціях та лікарських формах, які можуть бути наявні в мінімальній кількості. Тому запропоновано та розроблено методика визначення технологічних домішок у субстанції Тіотріазоліну методом вискоелективної рідинної хроматографії [9]. Для аналізу використано 5 серій субстанції Тіотріазоліну: 511211, 471211, 100112, 660312, 670312.

Працювали за методикою, розробленою сумісно з фахівцями ДП «Завод хімічних реактивів» НТК «Інститут монокристалів» НАН України».

Експериментально дібрано умови для визначення технологічних домішок методом ВЕРХ: об'єм проби; час утримання; колонка; склад рухомої фази та її швидкість; аналітична довжина хвилі детектора.

Визначення технологічних домішок проводили за наступних умов:

- Колонка Prontosil C18, 4.6*250 mm, діаметр частинок 5 мкм;
- Елюент: 10% метанолу – 90% фосфатного буфера, що містить 0,68 г/л дигідрофосфату калію та фосфорну кислоту (рН 3);
- Швидкість рухомої фази: 1 мл/хв;
- Аналітична довжина хвилі детектора: 220 нм;
- Об'єм проби, що вводиться: 20 мкл.

Виготовлення розчинів

Випробувані розчини. Близько 0,01 г (точна наважка) випробуваного зразка Тіотріазоліну поміщають у мірну колбу на 10 мл, розчиняють у 5 мл елюенту та доводять об'єм розчину елюентом до мітки. Отримують розчини з концентрацією 1 мг/мл.

Розчин порівняння (А). 0,01 г 3-метил-1,2,4-тріазолілітіону та 0,01 г ацетилтіосемікарбазиду поміщають у мірну колбу на 100 мл, розчиняють у 50 мл води і доводять до мітки водою.

Розчин порівняння (В). 0,5 мл розчину порівняння (А) поміщають у мірну колбу на 10 мл і доводять до мітки водою. Отримують розчин із вмістом технологічних домішок по 0,005 мг/мл (0,5% від вмісту основної речовини у випробуваних розчинах).

Розчин для перевірки придатності хроматографічної системи. 0,01 г ФСЗ Тіотріазоліну поміщають у мірну колбу на 10 мл, розчиняють у 5 мл елюента, додають 0,5 мл розчину порівняння (А) і доводять до мітки елюентом. Отримують розчин із вмістом основної речовини 1 мг/мл і технологічних домішок по 0,005 мг/мл (0,5% від вмісту основної речовини).

Проведення аналізів

Хроматографували випробуваний розчин Тіотріазоліну, розчин порівняння (В) і розчин для перевірки придатності хроматографічної системи, отримуючи не менше трьох хроматограм. Хроматограму розчину порівняння В наведено на *рис. 2*.

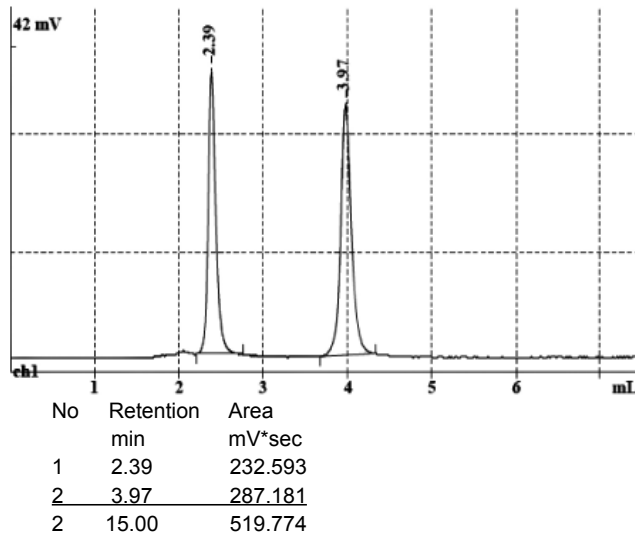


Рис. 2. Хроматограма розчину порівняння (В).

Хроматограму розчину для перевірки придатності хроматографічної системи наведено на *рис. 3*.

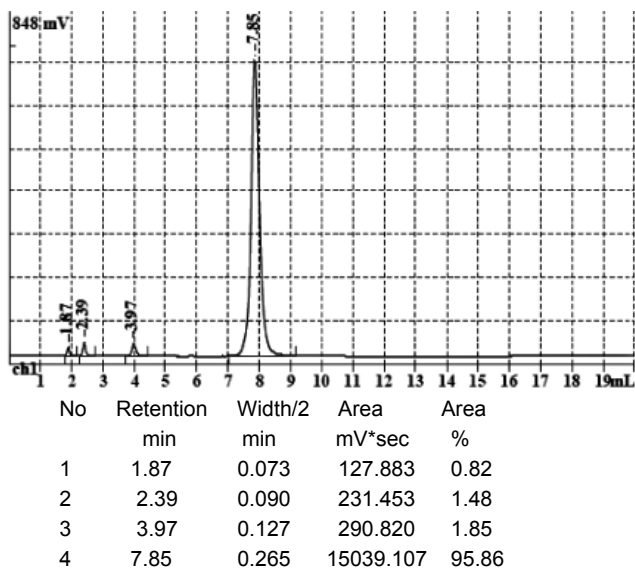


Рис. 3. Хроматограма розчину для перевірки придатності хроматографічної системи.

Утримуваний об'єм Тіотріазоліну складає близько 8 хв (у вигляді 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіооцтової кислоти).

Утримуваний об'єм технологічних домішок складає:

- близько 2,4 хв – піки ацетилтіосемікарбазиди і тіосемікарбазиду (часи утримування збігаються);
- близько 4 хв – пік 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіону.

Хроматограму фармакопейних стандартних зразків наведено на *рис. 4*.

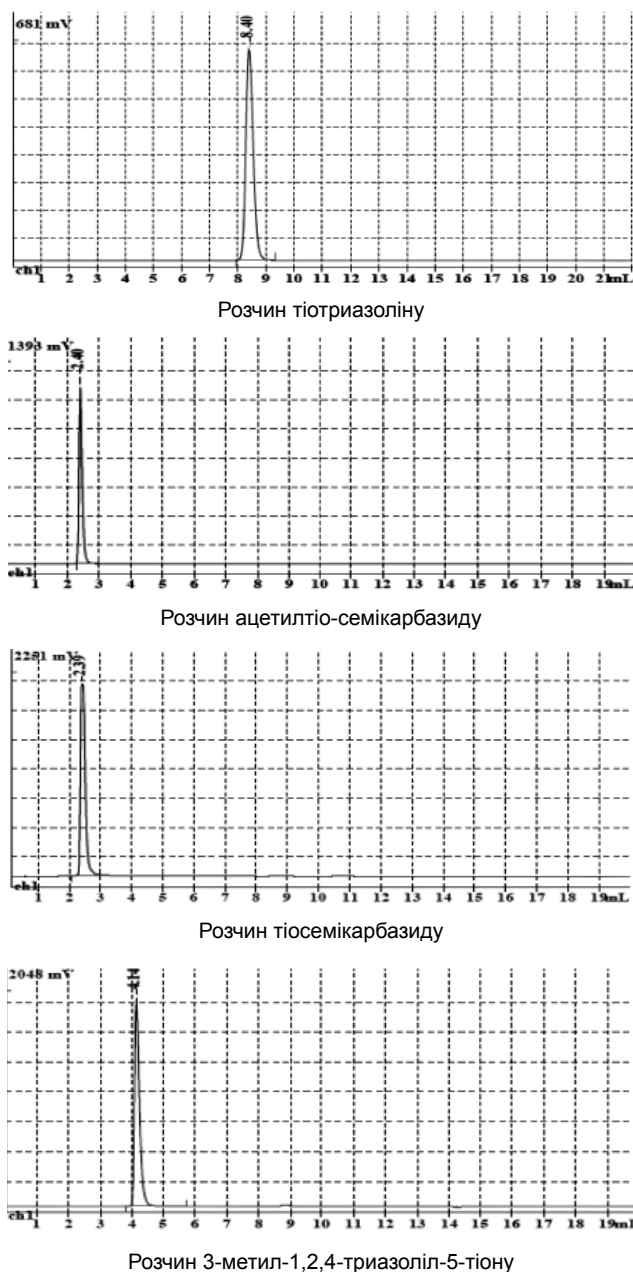
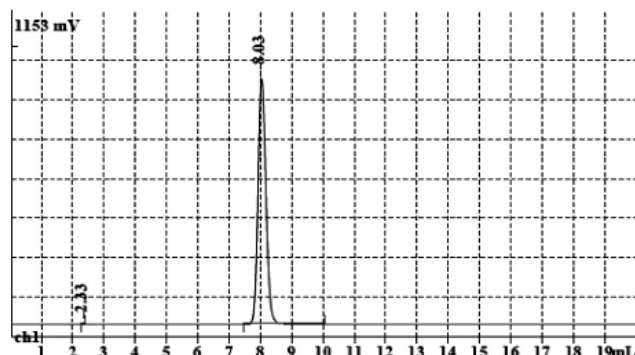


Рис. 4. Хроматограми фармакопейних стандартних зразків та технологічних домішок.

Результати хроматографічного визначення технологічних домішок у зразках Тіотриазоліну методом ВЕРХ та отримані хроматограми наведено на прикладі серії 670312 (рис. 5).



No	Retention min	Area mV*sec	Area %
1	2.32	1.267	0.01
2	8.03	17224.691	99.99
2	30.00	17225.958	100.00

Рис. 5. Хроматограма Тіотриазоліну серії 670312.

Після проведення аналізів зазначених серій встановлено, що всі досліджені серії відповідають вимогам ДФУ за показником «Технологічні домішки». Встановлено, що сумарна кількість у досліджених зразках не перевищує 0,04 %, а ДФУ регламентує граничний вміст технологічних домішок у межах 1%, в серії 670322, що наведена на рис. 5, вміст технологічних домішок складає 0,01%. Невизначених домішок у досліджуваних зразках не виявлено. Все зазначене дає змогу вважати, що розроблена методика є достовірною та відтворюваною.

Висновки

1. Розроблена нова високочутлива, об'єктивна та достовірна методика визначення технологічних домішок методом високоефективної рідинної хроматографії.
2. Розроблену методику запропоновано для введення до МКЯ та буде введена до неї при перереєстрації субстанції Тіотриазоліну.

Список літератури

1. Волошин Н.А. Тиотриазолин, тиоцетам, тиодарон в практике врача / Волошин Н.А., Визир В.А., Волошина И.Н. – Запорожье: ЗГМУ, 2008. – 224 с.
2. Георгиевский Г.В. Определение примесей в отечественных субстанциях производных 1,2,4-триазола методом ВЭЖХ / Георгиевский Г.В. // Фармаком. – 2009. – №2.
3. Державна Фармакопея України: Перше видання / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр» – 1 вид. – Х.: РІРЕГ, 2001.
4. Державна Фармакопея України: Доповнення 1 / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1 вид. – Х.: РІРЕГ, 2004. – 520 с.
5. Мазур И.А. Тиотриазолин / Мазур И.А., Волошин Н.А., Чекман И.С. – Запорожье, Львов: Наутилус, 2005. – 156 с.
6. Мазур И.А. Метаболитотропные препараты / Мазур И.А., Чекман И.С., Беленичев И.Ф. – Запорожье, 2007. – 309 с.
7. Мазур И.А. Тиотриазолин, тиодарон в лечении сердечно-сосудистой патологии / Мазур И.А., Волошин Н.А., Визир В.А., Беленичев И.Ф. – Запорожье: Печатный мир, 2011. – 303 с.
8. Метаболические кардиопротекторы / Визир В.А., Волошин Н.А., Мазур И.А., Беленичев И.Ф. – Запорожье, 2006. – 34 с.
9. Шату В.Д. Высокоэффективная жидкостная хроматография – Рига: Зинатне, 1988 – 390 с.
10. Adamovics J.A. Chromatographic analysis of pharmaceuticals / Adamovics J.A. – NewYork: MarselDekker, 1997.
11. Cardoni A. Insight into cytoprotection with metabolic agents / Cardoni A., Pasini E. // Eur. Heart J. – 1999. – Vol. 1. – P. 40–48.

12. *Ihor Belenichev* Effect of the Spin Trapping Compound PBN and Thiotriazoline on the Outcome from Experimental Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats / Ihor Belenichev, Sergej Pavlov, Elena Sokolik, Ivan Mazur, Nina Buhtiyarova, Lyudmila Kucherenko. // *Molecular Pharmacology*. – 2010. – Vol. 1, Issue 3. – С. 90–95.
13. *Roman I. Zubatyuk*. Crystal. Molecular structure and tautomerism of (5-methyl-1H-[1,2,4]triazol-3-ylsulfanyl)-acetic acid / Roman I. Zubatyuk, Svetlana V. Shichkina, Ivan A. Mazur // *Struct. Chem.* – 2008. – Vol. 19. – P. 407–412.
14. *Svetlana V. Shichkina*. Two polymorphs of morpholin-4-ium 2-(5-methyl-1H-1,2,4-triazol-3-ylsulfanyl) acetate / Svetlana V. Shichkina, Roman I. Zubatyuk, Ivan A. Mazur // *Crystal Struct. Communications*. – 2009. – Vol. C65. – P. o24–o26.
-

Відомості про авторів:

Кучеренко Л.І., д. фарм. н., доцент, зав. каф. фармацевтичної хімії ЗДМУ.

Ващенко В.В., к. хім. н., ст. науковий співробітник інституту НТК «Інститут монокристалів» НАН України.

Моряк З.Б., к. фарм. н., доцент каф. фармацевтичної хімії ЗДМУ.

Портна О.О., к. фарм. н., доцент каф. фармацевтичної хімії ЗДМУ.

Шаповалова Л.І., начальник ЦЗЛДП «Завод хімічних реактивів» НТК «Інститут монокристалів» НАН України.

Авраменко М.О., к. фарм. н., доцент каф. фармацевтичної хімії ЗДМУ.

Парнюк Н.В., студентка 5 курсу фармацевтичного факультету ЗДМУ

Хромильова О.В., асистент каф. фарм. хімії ЗДМУ.

Шабельник К.П., к. фарм. н., доцент каф. фармацевтичної хімії ЗДМУ.

Надійшла в редакцію 08.01.2013 р.