

УДК 615.25:54.062

Блажеєвський М.Є., Бондаренко Н.Ю., Івашура М.М.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АМЛОДИПІНУ БЕСИЛАТУ МЕТОДОМ ІНГІБУВАННЯ ХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ

Національний фармацевтичний університет, кафедра фізичної та колоїдної хімії

Амлодипін (*A*) ((±)-2-[(2-аміноетокси) метил]-4-(2-хлорфеніл)-1,4-дигідро-6-метил-3,5-піридин дикарбонової кислоти 3-етил 5-метиловий ефір) у вигляді бесилату та малеату належить до групи пролонгованих вибіркових блокаторів кальцієвих каналів, похідних дигідропіридину. У медичній практиці застосовується як антиангінальний та гіпотензивний засіб для лікування серцево-судинних захворювань. Його випускають у вигляді порошку-субстанції, а також готових лікарських форм (таблетки по 2,5, 5 та 10 мг).

Для кількісного визначення *A* фармакопея Великобританії (BPh, 2009) рекомендує використовувати метод рідинної хроматографії [10]. У науковій літературі описані методики кількісного визначення препарату методом спектрофотометрії – за власним світлопоглинанням [1, 4, 13, 15] та за продуктом реакції з алоксаном [7, 8]; кінетико-спектрофотометричним методом у субстанції та лікарських препаратах [11], а також методами хроматографії [6, 9, 13, 14], хроматомас-спектрометрії [5] та інверсійної вольтамперометрії [12].

Метою роботи – розроблення методики кількісного визначення вмісту основної речовини *A* у субстанції (модельних розчинах препарату) методом хемілюмінесценції (*ХЛ*) з використанням як індикаторної нової аналітичної реакції каталітичного окиснення люмінолу (H_2L) гідроген пероксидом (H_2O_2) в присутності геміну (*Hem*), в якій препарат виявляє інгібіторні властивості.

Для з'ясування оптимальних умов вивчали вплив порядку змішування розчинів H_2L , натрій гідроксиду, H_2O_2 , *A* і *Hem* та їх

концентрацій на інтенсивність ($I_{\text{хл}}$) виникаючої ХЛ фотоелектричним методом у дискретному режимі.

Експериментальна частина

Для досліджень використовували субстанцію амлодипіну бесилату, що відповідає вимогам ВРh [10].

Вихідний 0,001 М розчин люмінолу (H_2L) виготовляли з очищеного комерційного препарату кваліфікації ч.д.а. (НПФ «Синбіас») перекристалізацією з льодової ацетатної кислоти в присутності активованого вугілля, а відтак – з насиченого розчину лугу за точною наважкою у 0,01 М розчині натрій гідроксиду. У роботі використовували розчини, виготовлені за Гіллебрандтом [2].

Приготування розчину натрій гідроксиду без карбонатів 0,1720 моль/л. До 50 г натрій гідроксиду х.ч. додавали 50 г дистильованої води, ретельно перемішували та залишали на два тижні при 20°C. Відбирали за допомогою піпетки 10 мл розчину та переносили у мірну колбу на 100 мл. Об'єм розчину доводили до позначки щойно одержаною дистильованою водою, перемішували та щільно закорковували. Точну концентрацію розчину встановлювали за бурштиною кислотою методом кислотно-основного титрування з фенолфталеїном.

Розчин гідроген пероксиду (H_2O_2) 6% концентрації готували із 50% препарату о.с.ч. (Чехія) розбавленням його двічі дистильованою водою з наступним контролем вмісту гідроген пероксиду перманганатометрично [3].

Вихідний розчин геміну ($Нem$) 0,1 мг/мл виготовляли розчиненням 10 мг геміну виробництва фірми «Fluka» у 75 мл 0,5% розчину калію гідрофосфату при нагріванні до 323 К. Об'єм доводили до 100 мл двічі дистильованою водою при 293 К і перемішували. Робочий розчин з концентрацією геміну 1,0 мкг/мл виготовлений шляхом розбавлення вихідного розчину двічі дистильованою водою. Розчин придатний до використання протягом доби.

Для виготовлення розчинів *A* використовували метанол х.ч.

Приготування розчину фармакопейного стандартного зразку (ФСЗ ДФУ) амлодипіну (A). Біля 0,06 г (точна наважка) ФСЗ ДФУ амлодипіду бесилату переносили у мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняли при перемішуванні у 70 мл метанолу та доводили об'єм розчину тим самим розчинником до позначки. Розчини *A* меншої концентрації виготовляли шляхом розбавлення розчину ФСЗ ДФУ метанолом.

Інтенсивність хемілюмінесценції вимірювали у дискретному режимі в відносних одиницях (відн.од.) на установці з фотоелектронним помножувачем ФЭУ-84-А, вимірювачем малих струмів ИМТ-0,5 і швидкодіючим (постійна часу 0,1с) потенціометром-самописцем. Для змішування розчинів використовували кварцову кювету циліндричної форми діаметром 30 мм з робочим об'ємом 10 мл. При проведенні дослідів зберігали такий порядок змішування реагентів: до суміші лужного розчину люмінолу та гідроген пероксиду додавали розчин випробуваного препарату *A*, а відтак за допомогою піпеткового дозувача П-1 0,50 мл розчину геміну і реєстрували кінетичну криву інтенсивність хемілюмінесценції ($I_{хл}$) - час ($xв$). Дозувач влаштований у зйомний тримач, який ізолює фотокатод фотоелектронного помножувача від стороннього світла, а відтак дозволяє працювати при звичайному освітленні. Паралельно виконували контрольний дослід (за відсутністю препарату з таким же порядком змішування реагентів, як перше). Усі досліди виконували при температурі 293 К.

Результати та їх обговорення

У результаті проведених досліджень було встановлено, що оптимальним є порядок змішування, коли останнім додається розчин *Нет*. Оптимальними концентраціями реактивів у даній *XЛ* системі є: $c(NaOH) = 0,052$ моль/л, $c(H_2O_2) = 0,15\%$, $c(H_2L) = 1 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $C(Нет) = 5 \cdot 10^{-2}$ мкг/мл.

Кінетична крива виникнення $XЛ$ за відсутності інгібітора нагадувала спалах з подальшим згасанням $XЛ$ за експоненціальним законом. При додаванні інгібітора максимальна $I_{xл}$ зменшувалась прямо пропорційно його концентрації. Інгібіторна дія A , ймовірно, полягає у зв'язуванні проміжних активних форм Оксигену, які відповідальні за виникнення емітера $XЛ$. Механізм інгібування реакції $XЛ$ окиснення H_2L наведений на рис.1.

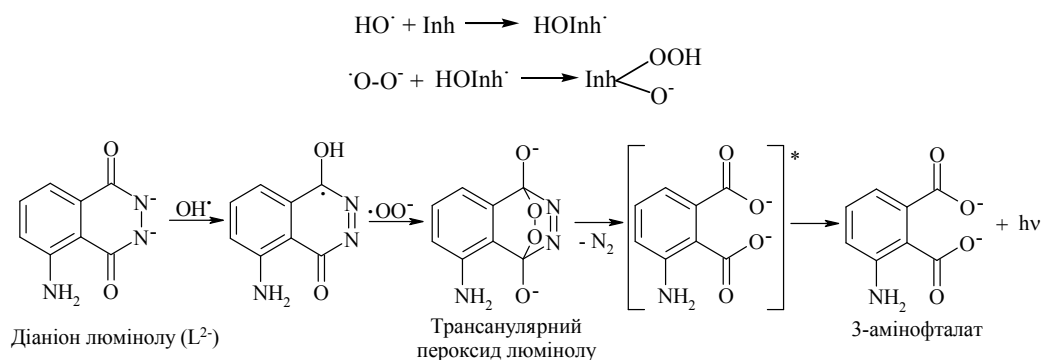


Рис.1. Механізм інгібування $XЛ$ в реакції окиснення люмінолу у присутності аналіту (A).

Нахил прямої на графіку залежності в координатах рівняння Штерна-Фольмера свідчить про достатньо високу ефективність гасія (рис.2).

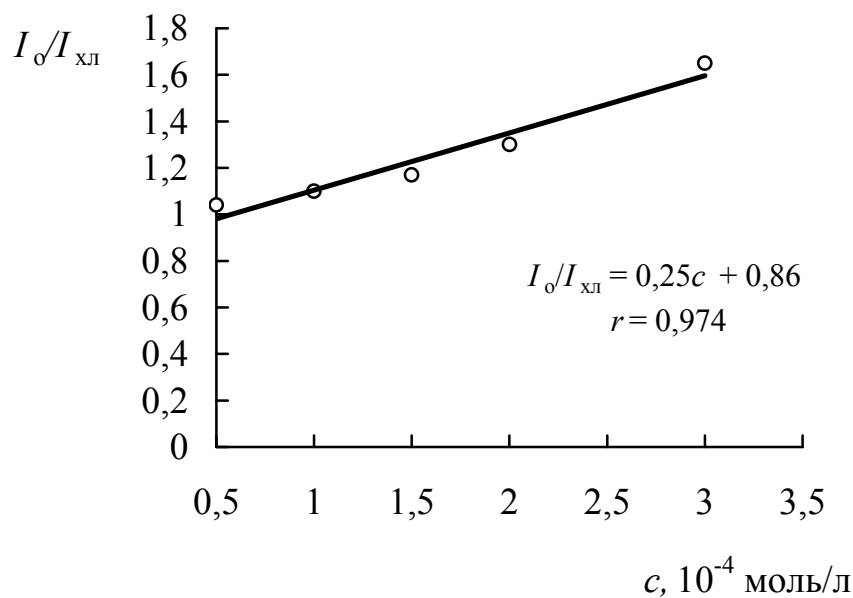


Рис. 2. Залежність $I_0/I_{xл}$ від концентрації інгібітора A в системі $H_2L - H_2O_2 - (A) - Нем$.

За аналітичний сигнал нами було обрано величину, яка являє собою різницю інтенсивностей $XЛ$ в контрольному (I_0) та робочому досліді ($I_{хл}$), $\Delta I = I_0 - I_{хл}$.

Методика кількісного визначення вмісту основної речовини у субстанції A методом $XЛ$. У кварцову кювету послідовно вносять: 3,00 мл 0,172 моль/л натрій гідроксиду, 1,00 мл 10^{-3} моль/л розчину H_2L , двічі дистильовану воду ($10 - x$, де x – сумарний об'єм усіх реактивів і проби, у мл), 0,5 мл 3% H_2O_2 , 3,00 мл (0 - 4,00 мл при побудові градуювального графіка) розчину 0,56 мг/мл розчину препарату, ретельно перемішують струшуванням, поміщають кювету у світлонепроникну камеру фотометра, відкривають шторку, вмикають самопишучий потенціометр і вливають 0,50 мл 1,0 мкг/мл розчину геміну в затемнених умовах камери. Реєструють кінетичну криву хемілюмінесценції. Знаходять максимальну інтенсивність хемілюмінесценції у контрольному (I_0) та робочому досліді ($I_{хл}$). Градуювальний графік $XЛ$ визначення A представлений на рис.3 ($\Delta I = 266,9C - 10,1$, $r = 0,999$).

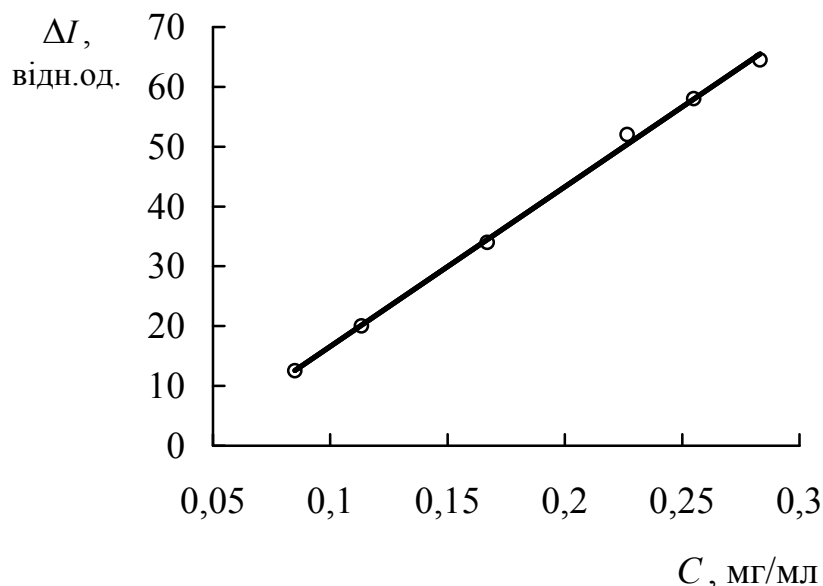


Рис.3. Градуювальна залежність кількісного визначення A за ефектом інгібування $XЛ$ в системі $H_2L - H_2O_2 - (A) - Het$

Кількісне визначення A у модельних розчинах субстанції виконували методом стандарту, використовуючи лінійні ділянки згаданої вище концентраційної залежності ΔI . Результати кількісного визначення амлодипіну бесилату наведені в табл. Правильність результатів аналізу перевіряли методом «уведено - знайдено».

Отже, нами розроблена нова вибіркова методика кількісного визначення амлодипіну в субстанції лікарської речовини (модельних розчинах) методом хемілюмінесценції за ефектом інгібування люмінолової реакції в системі $H_2L - H_2O_2 - (A) - Het$.

Таблиця

Результати кількісного визначення амлодипіну бесилату у модельних розчинах субстанції ($n = 5, P = 0,95$)

Вміст амлодипіну бесилату, мг/мл	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
0,167	0,165	$\bar{X} = 0,164$
	0,163	$S = \pm 4,76 \cdot 10^{-3}$
	0,157	$S_{\bar{X}} = \pm 2,13 \cdot 10^{-3}$
	0,170	$\Delta \bar{X} = \pm 5,92 \cdot 10^{-3}$
	0,166	$S_r = \pm 2,9 \%$
		$\delta = - 1,80\%$

Висновки:

З'ясовані умови та розроблена методика кількісного визначення амлодипіну бесилату у модельних розчинах субстанції кінетичним методом за ефектом інгібування хемілюмінесценції у системі $H_2L - H_2O_2 - (A) - Het$. При визначенні 0,167 мг/мл амлодипіну бесилату $RSD = 2,9\%$ ($\delta = - 1,80\%$). Опрацьована методика придатна для визначення однорідності дозування амлодипіну бесилату у готових лікарських формах.

Література:

1. Бурлака Ю.В. Спектрофотометричне визначення амлодипіну бесилату в субстанції / Ю.В. Бурлака, О.О. Тарханова, С.О. Васюк та інш. // Запорозький мед. журн. – 2011. – Т. 13, № 2. – С. 50 – 52.
2. Гиллебранд В.Ф. Практическое руководство по неорганическому анализу. - М.: Госхимиздат, 1966. – 1112 с.
3. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х.: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – 620 с.
4. Маміна О.О. Розробка методів кількісного визначення амлодипіну, придатних для хіміко-токсикологічного аналізу / О.О. Маміна, Н.М. Бондар // Фарм. журн. – 2005. - № 5. – с. 87 – 92.
5. Мирошніченко І.І. Определение содержания амлодипина в плазме крови методом тандемной хроматомасс-спектрометрии / І.І. Мирошніченко, А.А. Лелишенцев, Ю.М. Калмыков и др. // ХФЖ. – 2008. - № 8. – С.54 – 56.
6. Тимошик Ю.В. Застосування алоксану як детектуючого реагенту для амлодипіну бесилату / Ю.В. Тимошик, В.В. Петренко // Фарм. журн. – 2009. - № 5. – с. 104 – 106.
7. Тимошик Ю.В. Розробка способу та валідація методики кількісного визначення амлодипіну бесилату в таблетках / Ю.В. Тимошик, В.В. Петренко // Фарм. журн. – 2006. - № 6. – с. 62 – 68.
8. Тимошик Ю.В. Спектрофотометричне визначення амлодипіну бесилату в його лікарських формах / Ю.В. Тимошик // Запорозький мед. журн. – 2009. - № 4. – с. 112 – 113.
9. Argekar A.P. Simultaneous determination of atenolol and amlodipine in tablets by high-performance thin-layer chromatography / Argekar A.P., Powar S.G. // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2000. – V. 21. – P. 1137 – 1142.
10. British Pharmacopoeia. London: The Stationery Office. – 2009. - V. 1,2. – 6481 P.

11. Hemmateenejad B. A kinetic spectrophotometric method for determination of amlodipine and nifedipine in pharmaceutical preparations / B. Hemmateenejad, R. Miri, R. Kamali // J. Iran. Chem. Soc. – 2009. – V. 6, № 1. – P. 113 – 120.
12. Kazemipour M. Use of adsorptive square-wave anodic stripping voltammetry at carbon paste electrode for the determination of amlodipine besylate in the pharmaceutical preparations // Журн. аналит. химии. – 2009. – Т. 64, № 1. – С. 74 – 79.
13. Malesuik M.D. Determination of amlodipine in pharmaceutical dosage forms by liquid chromatography and ultraviolet spectrophotometry / Malesuik M.D., Cardoso S.G., Bajerski L. et al. // J. AOAC Int. – 2006. – V. 89, № 2. – P. 359 – 364.
14. Raghu Naidu K. Stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of amlodipine and benazepril hydrochloride from their combination drug product / K. Radhu Naidu, Udhav N. Kale, Murlidhar S. S. et al. // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2005. – V. 39. – P. 147 – 155.
15. Wankhede S.B. Simultaneous estimation of amlodipine besilate and olmesartan medoxomil in pharmaceutical dosage form / Wankhede S.B., Wadkar S.B., Raka K.C. et al. // Indian J. Pharm. Sci. – 2009. – V. 71, № 5. – P. 563 – 567.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АМЛОДИПІНУ БЕСИЛАТУ МЕТОДОМ ІНГІБУВАННЯ ХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНЦІ

Блажеєвський М.Є., Бондаренко Н.Ю., Івашура М.М.

З'ясовані умови та розроблена методика кількісного визначення вмісту основної речовини амлодипіну бесилату у модельних розчинах субстанції кінетичним методом інгібування хемілюмінесценції в системі $H_2L - H_2O_2 - (A) - Het$. При визначенні амлодипіну бесилату $RSD = 2,9\%$ ($n = 5, P = 0,95$), $\delta = - 1,80\%$.

Ключові слова: амлодипін, хемілюмінесцентний аналіз, люмінол, інгібування.

Національний фармацевтичний університет (м.Харків)

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМЛОДИПИНА БЕСИЛАТА МЕТОДОМ ИНГИБИРОВАНИЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Блажеевский Н.Е., Бондаренко Н.Ю., Ивашура М.Н.

Подобраны условия и разработана методика количественного определения содержания основного вещества амлодипина бесилата в модельных растворах субстанции кинетическим методом ингибирования хемилюминесценции в системе $H_2L - H_2O_2 - (A) - Hem$. При определении амлодипина бесилата $RSD \leq 2,9\%$ ($n = 5, P = 0,95$), $\delta = - 1,80\%$.

Ключевые слова: амлодипин, хемилюминесцентный анализ, люминол, ингибирование.

Национальный фармацевтический университет (г.Харьков)

AMLODIPINE BESILATE QUANTITATIVE DETERMINATION BY METHOD OF CHEMILUMINESCENCE INHIBITION

Blazheyevskyy M.Ye., Bondarenko N.Yu., Ivashura M.M.

The method of amlodipine besilate chemiluminescent determination in model solutions substance is based on inhibition of luminol chemiluminescent oxidation by hydrogen peroxide, reaction catalyzed by hemin have been elaborated. While amlodipine besilate assay $RSD \leq 2.9\%$ ($n = 5, P = 0.95$), $\delta = - 1,80\%$.

Keywords: amlodipine, chemiluminescence analysis, luminol, inhibition.

National University of pharmacy (Kharkiv)