

Рекомендована д.ф.н., професором П.Д.Пашинєвим

УДК 615. 454. 2: 54. 061 / . 062: 547. 495. 9: 546. 47

РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕЙСТВУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В СУППОЗИТОРИЯХ «ЛИПАРГИН»

А.И.Тихонов, А.Т.Олмесекова

Национальный фармацевтический университет

Проведен качественный анализ активных веществ в суппозиториях андрогенного действия. Определено количественное содержание суммы β -каротиноидов, цинка сульфата гептагидрата, аргинина в препарате «Липаргин».

В связи с возросшими проблемами в терапии мужского бесплодия перспективным направлением является создание и внедрение в медицинскую практику новых терапевтически эффективных лекарственных препаратов, обладающих широким спектром фармакологической активности [4, 6, 8].

По результатам исследований последних лет выявлено повышение эффективности лечебного действия простатопротекторов, особенно при лечении пациентов с такими осложнениями, как эректильная дисфункция, бесплодие, если вместе с ними используют препараты цинка и донаторы оксида азота (аргинин) [1, 9, 10]. На кафедре аптечной технологии лекарств им. Д.П.Сало под руководством д.ф.н., проф. А.И.Тихонова был разработан новый состав суппозиторий андрогенного действия «Липаргин», включающий биологически активную субстанцию природного происхождения – липофильный экстракт обножки пчелиной (ЛЭОП), цинка сульфата гептагидрат и аминокислоту аргинин [5, 7].

На сегодняшний день научно обоснованы состав и технология приготовления суппозиторий андрогенного действия, исследованы структурно-механические свойства суппозиторной массы, методом термографического анализа определен температурный режим введения лекарственного вещества в основу [2, 3].

Целью данной работы является разработка методик качественного и количественного определения действующих веществ в препарате «Липаргин».

Экспериментальная часть

Для изучения компонентов суппозиторий «Липаргин» рекомендуется применять комплекс физических, химических и физико-химических методов.

Идентификацию липофильной основы проводили на основе ее гидрофобности: один суппозиторий помещали в коническую колбу емкостью 100 мл, прибавляли 30 мл воды Р, нагревали на водяной бане до расплавления основы и аккуратно перемешивали. Колбу охлаждали на льду; на поверхности образовывался застывший жировой слой. Водный слой декантировали в другую колбу.

К полученному водному слою прибавляли 0,1 г активированного угля, перемешивали и фильтровали раствор через бумажный фильтр «синяя лента» и использовали для идентификации аргинина и цинка сульфата гептагидрата.

Идентификацию аргинина рекомендуется проводить комбинацией химических реакций на α -аминокислоты с раствором нингидрина Р и на производные гуанидина с раствором α -нафтола Р и натрия гипохлорита Р, а также данных о времени его удерживания на хроматограммах, полученных при количественном определении.

Для идентификации цинка сульфата гептагидрата проводили качественные реакции на цинк с раствором калия ферроцианида Р, а также раствором натрия сульфида Р и на сульфаты с раствором бария хлорида Р1. Его количественное определение проводили методом комплексонометрического титрования в среде аммиачного буферного раствора, конечную точку титрования устанавливали с помощью протравного черного (эриохром чёрный Т).

Качественные реакции на ЛЭОП проводили следующим образом: один суппозиторий помещали в пробирку, прибавляли 5 мл хлороформа, перемешивали до растворения основы и также фильтровали через бумажный фильтр «синяя лента». Полученный фильтрат исследовали на наличие токоферолов и каротиноидов. Для этого проводили реакции с раствором сурьмы (III) хлорида Р, а также раствором кислоты фосфорно-молибденовой Р в ледяной уксусной кислоте Р. Результаты проведенных исследований представлены в табл. 1.

В основе количественного определения суммы β -каротиноидов ЛЭОП лежит метод адсорбционной спектрофотометрии в УФ-области с использованием прибора СФ-46, обработку результатов осуществляли с помощью программного обеспечения «Спектр» для «Windows». Один суппозиторий (точная навеска) помещали в коническую колбу ёмкостью 100 мл, добавляли 30 мл гексана, подогревали на водяной бане до растворения основы и полученную суспензию количественно с помощью 15 мл гексана переносили в делительную воронку ёмкостью 250 мл. Коническую колбу ополаскивали 50 мл воды Р и промывали этой водой гексановый раствор в делительной воронке. После тщательного расслаивания водную вытяжку сливали в коническую колбу ём-

Результаты идентификации компонентов суппозиториев «Липаргин»

Качественные реакции	Исследуемые объекты			
	аргинин	цинка сульфата гептагидрат	ЛЭОП	суппозитории «Липаргин»
С раствором нингидрина	фиолетовое окрашивание	–	–	фиолетовое окрашивание
С раствором α-нафтола и натрия гипохлорита	красно-оранжевое окрашивание	–	–	красно-оранжевое окрашивание
С раствором калия ферроцианида (соли цинка)	–	белый осадок	–	белый осадок
С раствором натрия сульфида (соли цинка)	–	белый осадок	–	белый осадок
С раствором бария хлорида (сульфаты)	–	белый осадок	–	белый осадок
С раствором сурьмы (III) хлорида (каротиноиды)	–	–	зеленое окрашивание	зеленое окрашивание
С раствором кислоты фосфорно-молибденовой (токоферолы)	–	–	зеленое окрашивание	зеленое окрашивание

костью 250 мл. Процедуру повторяли еще дважды порциями по 50 мл воды, собирая водные извлечения в одну колбу. Объединенные водные извлечения в дальнейшем использовали для количественного определения цинка сульфата. Гексановый раствор фильтровали через бумажный фильтр «синяя лента», в который было помещено 5,0 г безводного натрия сульфата, в мерную колбу ёмкостью 50 мл. Делительную воронку дважды ополаскивали порциями по 3 мл гексана, промывали этими растворами фильтр, довели объём раствора до метки тем же растворителем и перемешивали (испытуемый раствор).

Оптическую плотность испытуемого раствора определяли на спектрофотометре при длине волны 450 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм. В качестве контрольного раствора использовали гексан. Параллельно измеряли оптическую плотность стандартного раствора калия дихромата, а в качестве контрольного раствора использовали воду Р.

Содержание суммы каротиноидов X (в перерасчете на β-каротин) в миллиграммах рассчитывают по формуле (должно быть от 0,07 до 0,18 мг):

$$X = (A \times V \times 0,00208 \times m_{np}) / (A_{ст} \times m_n),$$

где: A – оптическая плотность испытуемого раствора; $A_{ст}$ – оптическая плотность раствора стандартного образца калия дихромата; 0,00208 – количество β-каротина в миллиграммах в растворе, который соответствует по окраске раствору стандартного образца калия дихромата; V – объём испытуемого раствора (50 мл); m_{np} – масса суппозитория по прописи; m_n – масса навески.

Количественное определение цинка сульфата гептагидрата рекомендуется проводить с использованием комплексонометрического титрования по методике, предложенной в ГФ Х СССР, с. 739, которая обеспечивает четкий переход окраски индикатора. К объединенным водным извлечениям, полученным при промывании гексанового раствора, добавляют 5 мл аммиачного буферного раствора (рН 10,0), протрав-

ного черного и титруют 0,05 М раствором натрия эдетата до перехода окраски в синюю.

1 мл 0,05 М раствора натрия эдетата соответствует 0,01438 г цинка сульфата гептагидрата:

$$X(z) = (V \times КП \times T \times m_{cp}) / m_n,$$

где: V – объём натрия эдетата, ушедшего на титрование; $КП$ – коэффициент поправки к молярности титрованного раствора натрия эдетата; T – титр натрия эдетата по цинку сульфатгептагидрату; m_{cp} – масса суппозитория по прописи; m_n – масса навески. Содержание цинка сульфата (г) в одном суппозитории должно быть от 0,09 до 0,11 г. Результаты проведенного исследования приведены в табл. 3.

Количественное определение аргинина проводили методом жидкостной хроматографии (ВЭЖХ): 2 единицы препарата помещали в мерную колбу вместимостью 200 мл, довели объём раствора растворителем до метки, перемешивали на магнитной мешалке до полного растворения. Раствор фильтровали через стеклянный фильтр ПОР 16 под вакуумом (испытуемый раствор).

Попеременно хроматографировали испытуемый раствор и раствор сравнения, получая число параллельных хроматограмм (n) для каждого из растворов не менее, чем при проверке пригодности хроматографической системы в следующих условиях (рис. 2, 3):

- колонка размером 250×4,6 мм, заполненная сорбентом с привитой фазой октадецилсиликагель, модифицированный группами CN, размер частиц – 5 мкм, для которой выполняются требования раздела «Пригодность хроматографической системы»;
- подвижная фаза: буферный раствор фосфатный рН 6,0 : ацетонитрил (90 : 10), дегазированная любым удобным способом;
- длина волны детектирования – 200 нм;
- скорость потока – 1 мл/мин;
- температура термостата колонки – 30°C.

Таблица 2

Результаты определения содержания суммы каротиноидов в пересчете на β-каротин (мг/суп)

Масса навески, г	Оптическая плотность, A	Содержание суммы каротиноидов в пересчете на β-каротин мг/суп	Метрологические характеристики среднего результата определения
3,0172	0,767	0,0752	$\bar{x} = 0,07485$ $S^2 = 3,65 \times 10^{-6}; S = 1,91 \times 10^{-3}$ $S_x = 7,80 \times 10^{-4}; P, \% = 95$ $t(P,v) = 2,5706$ $\Delta x = 2,00 \times 10^{-3}$ $\Delta \bar{x} = 8,18 \times 10^{-4}$ $\bar{\epsilon}, \% = 1,093$
2,9565	0,773	0,0774	
2,9973	0,740	0,0731	
3,0234	0,758	0,0742	
3,0041	0,737	0,0726	
2,9880	0,773	0,0766	
3,0172	0,767	0,0752	

Примечание: $A_{cm} = 0,527$ нм

Таблица 3

Результаты комплексонометрического титрования цинка сульфат гептагидрата суппозиторий «Липаргин»

Масса навески, г	Объем титранта, V, мл	Содержание цинка сульфата гептагидрата, г/суп	Метрологические характеристики среднего результата определения
2,9648	6,94	0,101	$\bar{x} = 0,09966$ $S^2 = 6,66 \times 10^{-7}; S = 8,16 \times 10^{-4}$ $S_x = 3,33 \times 10^{-4}; P, \% = 95$ $t(P,v) = 2,5706$ $\Delta x = 8,57 \times 10^{-4}$ $\Delta \bar{x} = 3,50 \times 10^{-4}$ $\bar{\epsilon}, \% = 0,351$
2,9735	6,82	0,099	
3,0976	7,11	0,099	
3,0325	7,03	0,100	
3,0902	7,09	0,099	
2,9784	6,90	0,100	

Примечание: $KП = 1,0000$

Содержание аргинина (X) в одной единице препарата, в граммах, вычисляют по формуле (должно быть от 0,24 до 0,26 г):

$$x = (S_i \times m_0 \times 200 \times P) / (S_0 \times 2 \times 200 \times 100),$$

где: S_i – среднее значение площади пика аргинина, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора препарата; S_0 – среднее значение площади пика аргинина, вычисленное из хроматограмм раствора сравнения; m_0 – масса навески стандартного образца (СО) аргинина, взятой для раствора сравнения, в граммах; P – содержание аргинина в СО, в %.

Примечание. Приготовление раствора сравнения.

0,5 г (точная навеска) ФСО аргинина помещали в мерную колбу вместимостью 200 мл, прибавляли

100 мл растворителя, взбалтывали до полного растворения, доводили объем раствора растворителем до метки и перемешивали.

Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление растворителя.

500 мл воды Р помещали в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводили до метки метанолом Р, перемешивали. Раствор охлаждали до 20°C доводили до метки метанолом и фильтровали.

Раствор используют свежеприготовленным.

Результаты и их обсуждение

Проведенные реакции идентификации компонентов суппозиторий андрогенного действия подтвердили наличие действующих веществ в препарате «Липаргин» (табл. 1).

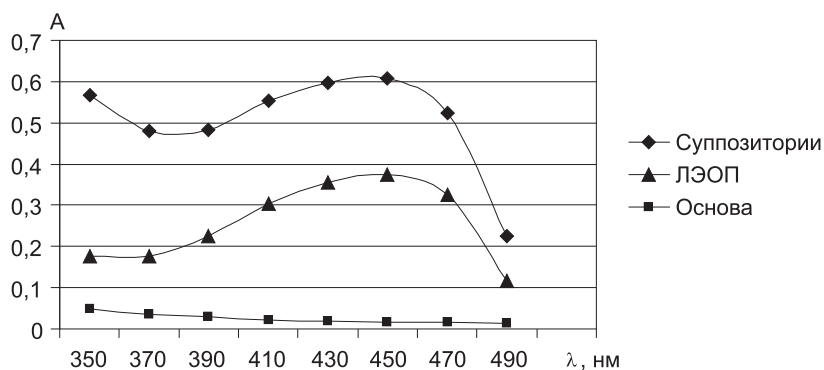


Рис. 1. УФ-спектры поглощения суппозиторий «Липаргин», ЛЭОП и основы.

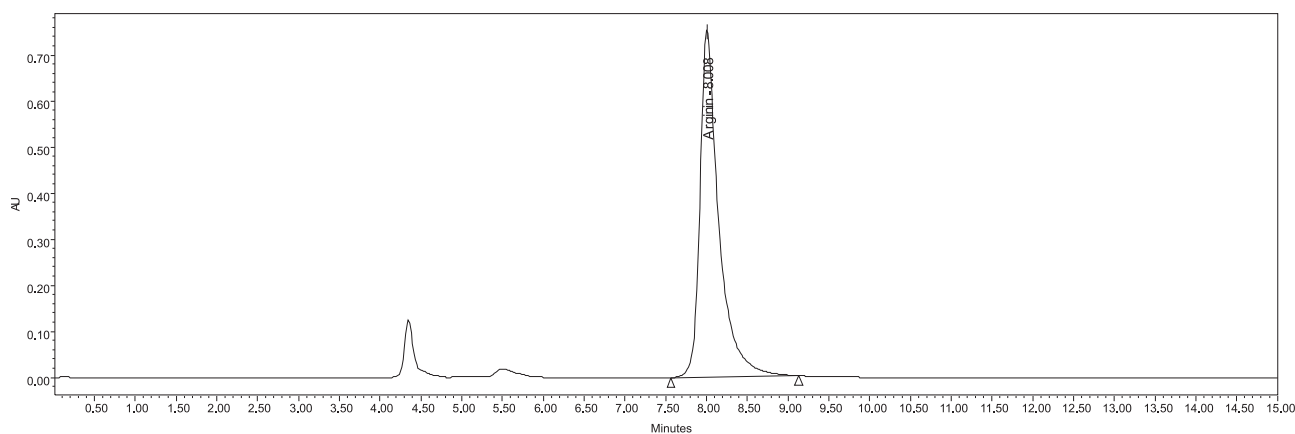


Рис. 2. Хроматограма розчину порівняння.

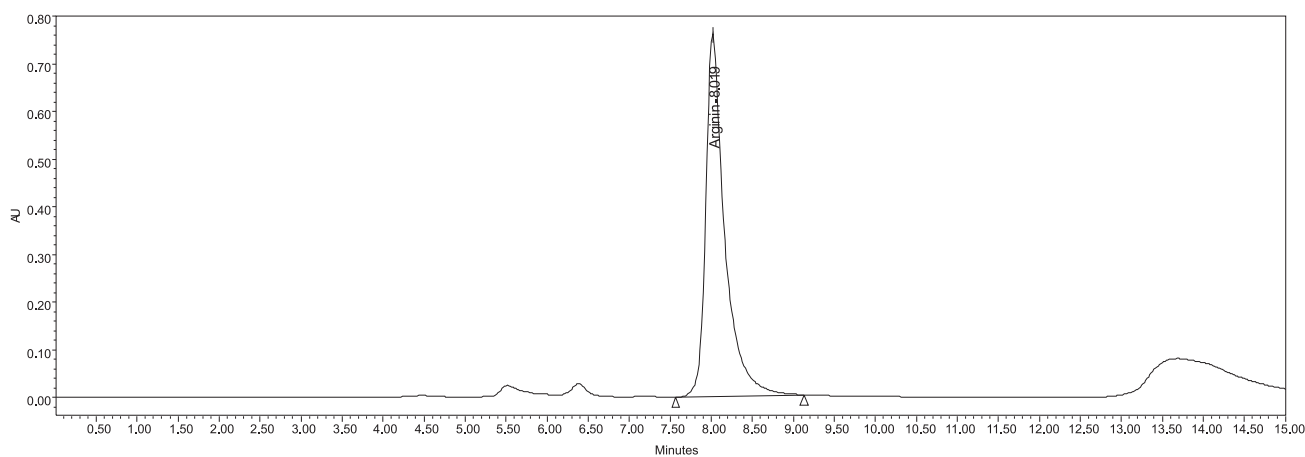


Рис. 3. Хроматограма досліджуваного розчину.

Адсорбційний спектр досліджуваного розчину, приготованого для кількісного визначення в області від 350 до 500 нм, має максимум поглинання при 450 ± 2 нм (рис. 1).

По приведеній методикі проведено визначення вмісту суми каротиноїдів в пересчеті на β -каротин (мг/суп) в експериментальній серії суппозиторіїв, результати якого приведені в табл. 2.

Дані статистичної обробки отриманих результатів свідчать про те, що середнє значення суми каротиноїдів становить 0,07485 мг/суп, відносна неопределеність середнього результату не перевищує 1,1%.

При кількісному визначенні цинку сульфата гептагідрата отримана величина відносної неопределеності середнього результату ($\bar{\epsilon}$, %) не перевищує 1%, що свідчить про високу точність аналізу та достовірність отриманих результатів (табл. 3).

Кількісне визначення та ідентифікацію аргініну проводили методом ВЕЖХ. Для цього поперемінно хроматографували порівняння, отримуючи від 2 до 6 хроматограм. Об'єм інжекції – 20 мкл.

Отримані хроматограми показують, що час утримання основного піка на хроматограмі досліджуваного розчину відповідає часу утримання піка на хроматограмі розчину порівняння ФСО аргініну.

Для площей піків аргініну з отриманих хроматограм розраховували відносне стандартне відхилення (RSD). Отримання паралельних хроматограм (n_0) припинили при досягненні вимог до (RSD), вказаних в табл. 4.

Результати кількісного визначення вмісту аргініну в експериментальній серії суппозиторіїв були піддані статистичній обробці та представлені в табл. 5. З даних табл. 5 випливає, що середнє вмісту аргініну в суппозиторіях «Ли-

Таблиця 4

Відносне стандартне відхилення кількісного визначення аргініну в суппозиторіях андрогенного дії

n_0	2	3	4	5	6
	RSD (%) <				
Для допуску вмісту $\pm 5,0\%$	0,25	0,67	0,96	1,19	1,38

Таблиця 5

Статистическая обработка результатов количественного определения аргинина в исследуемом препарате

x, г	v	\bar{x}	S^2	S	$S_{\bar{x}}$	P, %	t(P,f)	Δx	$\Delta \bar{x}$	$\bar{\epsilon}$, %
0,250	5	0,2495	$5,9 \cdot 10^{-6}$	$2,43 \cdot 10^{-3}$	$9,92 \cdot 10^{-4}$	95	2,5706	0,002549	0,001041	1,022
0,248										
0,251										
0,253										
0,246										
0,249										

паргин» составляло $\bar{x} = 0,2495$, относительная неопределенность среднего результата не превышала 1,1%.

ВИВОДИ

1. Изучены химические реакции и физико-химические свойства ингредиентов суппозиториев андрогенного действия «Липаргин».

2. Разработаны методики анализа, позволяющие надежно подтвердить наличие каждого компонента препарата.

3. Исследован адсорбционный спектр гексанового раствора суппозиториев.

4. Разработана методика определения суммы β -каротиноидов в препарате методом адсорбционной спектрофотометрии.

5. Определены условия и разработана методика определения цинка сульфата гептагидрата в суппозиториях методом комплексонометрического титрования.

6. На основании проведенных хроматографических исследований разработана методика идентификации и количественного определения аргинина методом ВЭЖХ.

7. Использованные методики количественного определения охарактеризованы статистическим методом модельных образцов.

8. Доказана возможность применения разработанных методик для стандартизации препарата «Липаргин» при внедрении его в производство.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алмакаева Л.Г., Литвинова Е.В. // Ліки України плюс. – 2011. – №1 (5). – С. 23-26.
2. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Доп. 2. – Х.: РИРЕГ, 2001. – 620 с.
3. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х.: РИРЕГ, 2001. – 556 с.
4. Доле Г.Р., Кона З., Юнзвирф А., Харгрив Т.Б. // Европейская урол. – 2004. – №46 (5). – P. 555-558.
5. Степанов Ю.М., Кононов И.Н., Журбина А.И., Филиппова А.Ю. // Журн. НАМН Украины. – 2004. – Т. 10, №1. – С. 340-352.
6. Чадаев В.Е., Козуб Н.И., Мироненко М.В. // Междунар. мед. журн. – 2006. – С. 80-83.
7. Щепликін Л.І., Гладкова А.І., Тихонов О.І. // Вісник фармації. – 2001. – №4. – С. 95-99.
8. Dohle G.R., Dieter T., Giwerstan A. et al. // Европейская Ассоциация Урологов. – 2010. – С. 7.
9. Doshi H., Oza Heena, Tekani Hemali et al. // Obstet Gynecol. India. – 2008. – Vol. 58, №2. – P. 152-155.
10. Sin-eng Chia, Choon-nam Ong, Lay-ha Chua et al. // J. of Androl. – 2000. – Vol. 21, №1. – P. 53-55.

УДК 615. 454. 2: 54. 061 / . 062: 547. 495. 9: 546. 47

РОЗРОБКА МЕТОДИК ЯКІСНОГО І КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ДІЮЧИХ РЕЧОВИН У СУПОЗИТОРІЯХ «ЛІПАРГІН»

О.І.Тихонов, А.Т.Олмесекова

Проведені дослідження з розробки методик якісного і кількісного визначення діючих компонентів у супозиториях андрогенної дії «Липаргин». Запропоновані сучасні методики відповідають вимогам ДФУ, характеризуються достатньою простотою, високою селективністю і дозволяють оцінити якість розробленого препарату.

UDC 615. 454. 2: 54. 061 / . 062: 547. 495. 9: 546. 47

DEVELOPMENT OF METHODS FOR QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF ACTIVE SUBSTANCES IN «LIPARGIN» SUPPOSITORIES

O.I.Tikhonov, A.T.Olmessekova

The research on development of methods of qualitative and quantitative determination of active substances in «Lipargin» suppositories with the androgenic action has been conducted. The modern methods proposed conform to the requirements of SPU; they are characterized by sufficient simplicity, high selectivity and allow to estimate the quality of the medicine developed.