

ВИЗНАЧЕННЯ НОВОГО ПРОТИСУДОМНОГО ЗАСОБУ “ДИБАМК” У КРОВІ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

В.А.Георгіянець, Н.І.Колочавіна, Н.Ю.Бевз, В.А.Ханін

Національний фармацевтичний університет

Ключові слова: протисудомна активність; дибамк; вискоєфективна рідинна хроматографія

Вивчено можливість кількісного визначення нового протисудомного препарату “Дибамк” у крові методом вискоєфективної рідинної хроматографії. Запропонована методика підготовки зразків плазми до визначення за допомогою твердофазної екстракції гідрофільно-ліпофільними картриджами HLB “OASIS” фірми “Waters” (США). Промивання та підготовку картриджів здійснювали метанолом та водою. Препарат елюювали метанолом. Визначення проводили хроматографуванням підготовлених метанольних розчинів з УФ-детектуванням при довжині хвилі 240 нм. Рухомою фазою служили ацетонітрил та фосфатний буфер. Встановлено, що площа піку на хроматограмі статистично достовірно корелює з концентрацією дибамку в плазмі, а графік залежності у вивчених межах концентрації є прямою лінією. Запропонована методика може бути використана для фармакокінетичних та токсикологічних досліджень, а також у майбутньому при вивченні біоеквівалентності генеричних препаратів.

Ученими Національного фармацевтичного університету розроблено новий перспективний протисудомний засіб “Дибамк”, який виявив свою ефективність на тваринах при судомах, викликаних як хімічними агентами коразолом, стрихніном, камфорою, так і електричним струмом [5]. З огляду на це зроблене припущення, що препарат може бути ефективним при застосуванні в медичній практиці при судомах різної етіології [7, 10, 13, 14]. Для встановлення фармакодинаміки препарату необхідним є розробка методів, які б дозволяли кількісно визначати його в біологічних рідинах.

Проводячи вивчення хімічних властивостей цього препарату та його стандартизацію, ми встановили, що кількісний вміст субстанції може бути визначений методом К'ельдаля [4]. Щодо лікарських форм, зокрема капсул, то доцільним є використання фізико-хімічних методів — УФ-спектрофотометрії або вискоєфективної рідинної хроматографії [2].

Особливістю визначення лікарських речовин у біологічних рідинах є їх дуже низька концентрація, особливо при проведенні фармакокінетичних досліджень протягом тривалого часу після введення. Крім того, дуже високою є вірогідність зв'язування препаратів з білками крові, що змінює їх властивості і потребує інших методів виділення або визначення. Тому при розробці методу визначення речовини в крові основним завданням є адекватна пробопідготовка, яка дозволяє зруйнувати можливий комплекс препарату з білками, виділити якомога більшу кількість препарату з урахуванням його розчинності та кислотно-основних властивостей.

Останнім часом найбільш застосовуваними для визначення лікарських препаратів, зокрема протисудомних та їх метаболітів у біологічних рідинах, є хроматографічні методи. Так, наприклад, для визначення хлорбензильних похідних бензоїлгідазину [8] та бенздіазепіну [12] використовується метод вискоєфективної рі-

динної хроматографії (ВЕРХ) з УФ-детектуванням; цей же спосіб був застосований для похідних карбамазепіну та дифеніну [9]; протисудомні препарати першого покоління (фенобарбітал, дифенін, карбамазепін, нітразепам) визначались методами газової та рідинної хроматографії [15].

Для відділення хімічних речовин від біологічних об'єктів раціональним є застосування твердофазної екстракції. Для цього можуть бути використані різноманітні картриджі з гідрофільно-ліпофільною, кислотно-основною та іншими системами розділення [11]. Для руйнування можливого комплексу з білками може бути застосована суміш метанолу з фосфатним буфером [6].

Матеріали та методи

Препарати та реактиви. Дибамк (субстанція синтезована на кафедрі фармацевтичної хімії НФаУ), метанол для хроматографії (“Merck”, Німеччина), калій фосфорнокислий двоаміщений, 99,9% (“Acros”, США), кислота ортофосфорна, хч (“РеаХім”, Україна), вода — бідистильована в осмотичній системі Millipore (Франція).

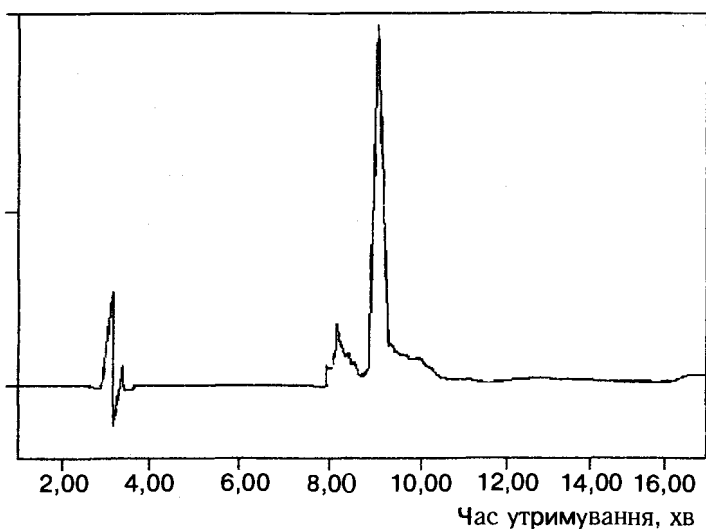


Рис. 1. Хроматограма спиртового розчину дибамку

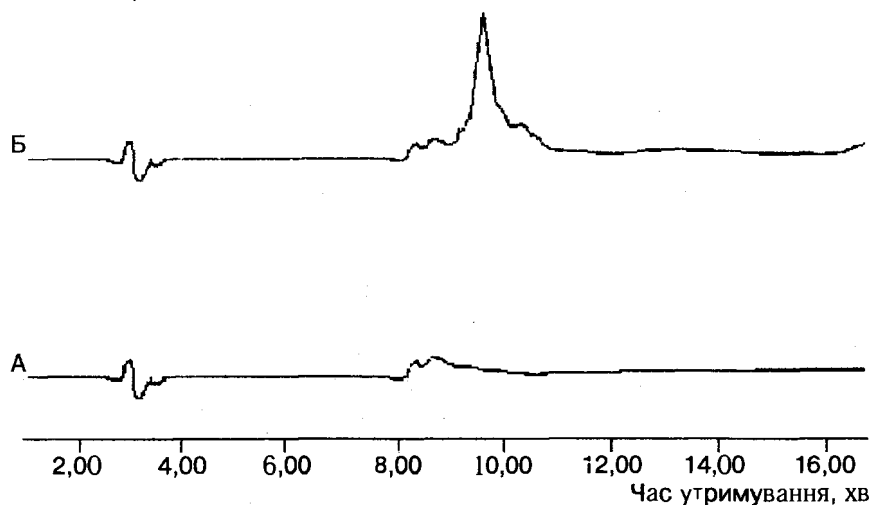


Рис. 2. Хроматограми зразка чистої плазми (А) та плазми зі спиртовим розчином дибамку (Б)

$r = 0,98442$

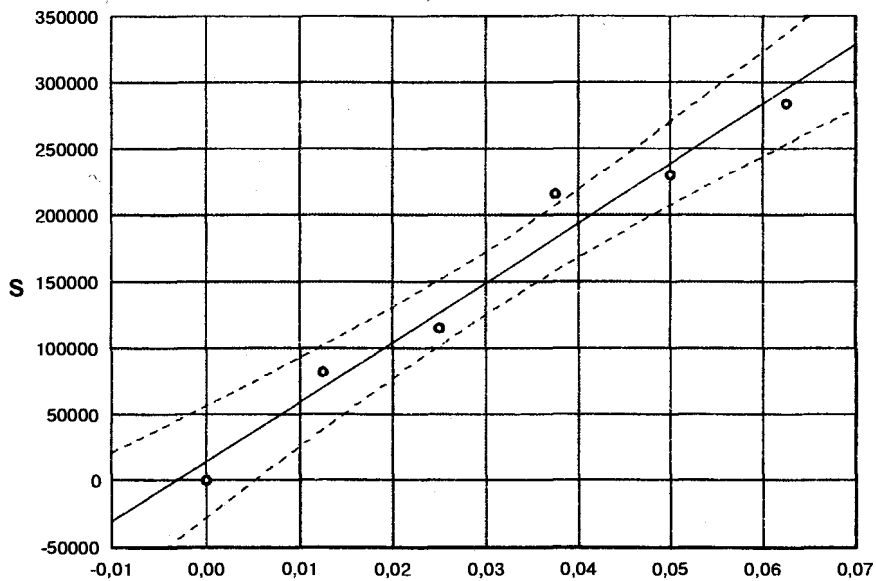


Рис. 3. Залежність площі піку на хроматограмі (S) від концентрації дибамку в зразках (C, мкг/мл)

Розчини. 0,01 г субстанції (точну наважку) розчиняли в мірній колбі на 10,00 мл в 7 мл метанолу (допускається нагрівання) до повного розчинення. Після охолодження об'єм доводили до мітки метанолом (розчин А).

0,5 мл розчину А вносили в мірну колбу на 10,00 мл і доводили метанолом до мітки (розчин 1, концентрація дибамку — 0,05 мг/мл).

1,0 мл розчину А вносили в мірну колбу на 10,00 мл і доводили метанолом до мітки (розчин 2, концентрація дибамку — 0,10 мг/мл).

1,5 мл розчину А вносили в мірну колбу на 10,00 мл і доводили метанолом до мітки (розчин 3, концентрація дибамку — 0,15 мг/мл).

2,0 мл розчину А вносили в мірну колбу на 10,00 мл і доводили метанолом до мітки (розчин 4, концентрація дибамку — 0,20 мг/мл).

2,5 мл розчину А вносили в мірну колбу на 10,00 мл і доводили метанолом до мітки (розчин 5, концентрація дибамку — 0,25 мг/мл).

Зразки для хроматографування. Кров дослідних тварин збирали в гепаринізовані пробірки, а потім розливали в 6 центрифужних пробірок по 2 мл, в кожену пробірку додавали по 2 мл розчинів 1-5 відповідно, до 6 пробірки додавали 2 мл метанолу. Пробірки центрифугували протягом 20 хв при швидкості 5000 об/хв до осадження крові. 2 мл плазми з кожної пробірки відбирали в центрифужні пробірки, додавали 2 мл суміші метанолу з фосфатним буфером рН 2,5 (1:1). Осад відділяли центрифугуванням (5000 об/хв, 20 хв). Рідину над осадом (розчини 1-6 Б) піддавали твердофазній екстракції з використанням картриджа Oasis фірми "Waters HLB". Картридж промивали 1 мл води, потім 1 мл метанолу. Потім в картридж вносили 1 мл досліджуваного розчину (1-6 Б) та промивали 50% розчином метанолу. Елюювання дибамку здійснювали за допомогою 1 мл метанолу.

Теоретична концентрація дибамку в розчинах після твердофазної екстракції становить: розчин 1 — 0,0125 мг/мл; розчин 2 — 0,025 мг/мл; розчин 3 — 0,0375 мг/мл;

Таблиця
Результати кількісного визначення дибамку в крові

№ досліджу	Концентрація дибамку				
	12,5 мкг/мл	25 мкг/мл	37,5 мкг/мл	50 мкг/мл	62,5 мкг/мл
1	12,44	24,90	37,43	49,92	62,32
2	12,44	24,94	37,47	49,95	62,41
3	12,46	24,97	37,50	49,98	62,44
4	12,51	24,99	37,52	50,01	62,46
5	12,51	25,02	37,53	50,02	62,50
6	12,53	25,04	37,53	50,44	62,56
Mean	12,48	24,98	37,50	50,05	62,45
S.D.	0,039	0,052	0,040	0,193	0,081
S.E.	0,016	0,021	0,016	0,079	0,033
S.V.	0,31	0,21	0,11	0,39	0,13

розчин 4 — 0,05 мг/мл; розчин 5 — 0,0625 мг/мл.

Хроматографування. Для кількісного визначення дибамку був використаний метод зворотnofазної рідинної хроматографії. Аналіз проводили на високоефективному рідинному хроматографі фірми "Waters Alliance 2690" зі спектрофотометричним детектором UV-VIS 486.

Умови аналізу:

- хроматографічна колонка Xterra розміром 4x250 мм, заповнена сорбентом з привитою фазою октадецилсилікагель, зернистість — 5 мкм;
- рухома фаза А: ацетонітрил, дегазований фільтрацією через фільтр ПОР-16;
- рухома фаза Б: фосфатний буфер, дегазований фільтрацією через фільтр ПОР-16;
- режим елюювання — градієнтний;
- довжина хвилі — 254 нм;
- швидкість потоку — 1 мл/хв;
- температура термостату колонки — 30°C;

- детектування — УФ-спектрофотометром;
- об'єм проби — 100 мкл.

Статистична обробка результатів

Отримані експериментальні дані піддавали статистичній обробці за програмою STATISTICA (StatSoft Inc., США). Для кожного показника розраховували: середнє арифметичне значення (Mean), стандартне відхилення середнього результату (S.D.), стандартну помилку (S.E.) та коефіцієнт варіації (S.V.). Достовірність розбіжностей між середніми значеннями визначали за t-критерієм Ст'юдента. Вірогідність отриманих результатів оцінювали на рівні статистичної значимості не меншої за 95% ($p < 0,05$) [1].

Результати та їх обговорення

На рис. 1 наведена типова хроматограма спиртового розчину дибамку. На рис. 2 — хроматограми плазми з метанолом (А) та

розчином дибамку (Б). Як видно з рис. 1, час утримування дибамку становить 9,59 хв. Для вибору хвилі детектування ми проаналізували УФ-спектр дибамку [3]. На відміну від вимог стосовно довжини хвилі, при якій визначення проводять із застосуванням УФ-спектрофотометрії, при ВЕРХ можна використовувати будь-які максимуми, що дозволяють відрізнити речовину. Ми використали для детектування довжину хвилі 254 нм, де знаходиться один з максимумів на УФ-спектрі.

Калібрувальний графік залежності площі піку дибамку на хроматограмі при довжині хвилі 254 нм від його концентрації в розчині являє собою пряму лінію в наведеному діапазоні концентрацій (рис. 3), коефіцієнт регресії становить 0,9844.

При проведенні кількісного визначення в 6 серіях після перерахунку площі піку на концентрацію ми отримали результати, наведені в таблиці.

Як видно з таблиці відносна похибка середнього результату становить 0,31; 0,21; 0,11; 0,39; 0,13% відповідно для концентрацій дибамку 12,5; 25; 37,5; 50; 62,5 мкг/мл.

Вміст дибамку у виготовлених зразках знаходиться в межах довірчого інтервалу, що свідчить про те, що наведена методика визначення є вільною від систематичних помилок.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено методику визначення дибамку в крові шурів методом високоефективної рідинної хроматографії.

2. Наведена методика може бути використана при визначенні фармакокінетики нового противосудомного засобу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Боровиков В.П. STATISTICA: искусство анализа данных на компьютере. Для профессионалов. — С.-Пб: Питер, 2001. — 656 с.
2. Георгіянци В.А., Бевз Н.Ю., Єрьоміна З.Г. Збірник наукових праць співробітників КМАПО ім. П.Л.Шупика. — К., 2002. — Кн. 3, вип. 11. — С. 666-670.
3. Георгіянци В.А., Єрьоміна З.Г., Бевз Н.Ю., Марусенко Н.А. // Фізіологічно активні речовини. — 2001. — №1 (31). — С. 45-47.

4. Георгіянець В.А., Бевз Н.Ю., Єрьоміна З.Г. та ін. // *Мед. хім.* — 2002. — Т. 4, №2. — С. 86-88.
5. Георгіянець В.А., Титкова Г.М. // *Ліки.* — 2001. — №5-6. — С. 80-82.
6. Попов С.Б., Георгіянець В.А., Прописнова В.В., Бакаев А.П. // *Клінічна фармація.* — 2003. — Т. 7, №2. — С. 28-34.
7. Hovinga C.A. // *Expert. Opin. Invest. Drugs.* — 2002. — Vol. 11, №10. — P. 1387-1406.
8. Kucukguzel G., Kucukguzel I., Ulgen M. // *Il Farmaco.* — 2000. — Vol. 55, №9-10. — P. 624-630.
9. Levert H., Odou P., Robert H. // *Biomed. Chromatogr.* — 2002. — Vol. 16, №1. — P. 19-24.
10. Manocha A., Sharma K.K., Mediratta P.K. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* — 2003. — Vol. 74, №2. — P. 343-350.
11. *Pharmaceutical Application Notebook.* Waters Corp. — 2001. — 62 p.
12. Rizzo M., De Sarro G., Zappala M., Grasso S. // *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* — 2002. — Vol. 775, № 1. — P. 71-78.
13. Sederpalm B. // *Eur. J. Pain.* — 2002. — №6, Suppt. A. — P. 3-9.
14. Weaver D.F. // *Can. J. Neurol. Sci.* — 2003. — Vol. 30, №1. — P. 4-7.
15. Wilson J.F., Watson I.D., Williams J. et al. // *Clin. Chem.* — 2002. — Vol. 48, №11. — P. 1963-1969.

Адреса для листування: 61002, м. Харків,
вул. Пушкінська, 53. Тел. (057) 706-30-63.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 25.12. 2003 р.

Інформаційне повідомлення відділу фармакологічного нагляду Державного фармакологічного центру МОЗ України

Про підозрювану побічну дію препарату **“Доларен”** (табл. по 500 мг/50 мг) виробництва “Nabros Pharma Pvt. Ltd”, Індія

Хворий 48 років на цукровий діабет II типу, поліартралгію був призначений доларен (перорально по 50 мг 2 рази на добу). Через добу після прийому препарату у хворої з'явився біль в епігастрії, печія, відчуття гіркоти у роті. Одночасно приймала інсулін, ліпоєву кислоту, вітаміни В₁₂, Е, АТФ. Доларен бів відмінений. Зазначені явища зникли без наслідків. З анамнезу відомо, що пацієнтка хворіє на цукровий діабет протягом семи років.

Алергологічний анамнез не обтяжений. Будь-які незвичайні реакції на ліки або хімічні речовини в минулому не відомі.

Інформація надійшла від Тернопільського регіонального відділення ДФЦ МОЗ України.

Про підозрювану побічну дію препарату **“Сибазон”** (р-н д/ін. 0,5% по 2 мл в амп.) виробництва ХДФП “Здоров'я народу”

Хворому 34 років із флегмоною одноразово внутрішньовенно ввели 2 мл розчину сибазону. Через 5 хвилин у нього розвинулись апное, дифузний ціаноз, при проведенні ШВЛ визначався високий опір диханню, аускультативно прослуховувалися сухі хрипи, “німі” зони над легеньми. Одночасно застосовувались анальгін, дроперидол, димедрол, кетамін. Сибазон відмінили, хворому ввели адреналін, дексаметазон. Незважаючи на вжиті заходи, настала смерть. Лікар вважає, що на розвиток цієї реакції могло вплинути захворювання пацієнта на обструктивний бронхіт. Відомо, що хворий також страждав на ожиріння IV ст., синдром Піквіка, еритремію, гіпертонічну хворобу, а також зловживав палінням.

Алергологічний анамнез не обтяжений. Будь-які незвичайні реакції на ліки або хімічні речовини в минулому не відомі.

Інформація надійшла від Вінницького регіонального відділення ДФЦ МОЗ України.