

ния хроматографического метода количественного определения.

Разработанный метод количественного определения является высокоселективным и высокочувствительным, что позволяет эффективно использовать его для проведения фармакокинетических исследований соединения VMA-99-82.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дерфель К. Статистика в аналитической химии. — М.: Мир, 1994.
2. Петров В. И., Озеров А. А., Новиков М. С. и др. // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. — 2004. — № 11. — С. 21—24.

3. Петров В. И., Озеров А. А., Новиков М. С. и др. // Фундаментальные исследования. — 2004. — № 1. — С. 78—79.

4. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Р. У. Хабриева. — М., 2005.

5. Guideline on bioanalytical method validation (EMA 2012). www.ema.europa.eu

6. Petrov V. I., Ozerov A. A., Novikov M. S. // Chemistry of Heterocyclic Compounds. — 2003. — Vol. 39 (9). — P. 1218—1226.

Контактная информация

Сучков Евгений Александрович — м. н. с. лаборатории фармакологической кинетики НИИ фармакологии, ВолгГМУ, e-mail: ewgenik@gmail.com

УДК 543.544.32:615.453.66

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕЙСТВУЮЩЕГО ВЕЩЕСТВА В ТАБЛЕТКАХ КЕМАНТАНА МЕТОДОМ ГАЗО-ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

**А. В. Толкачева, Л. Н. Грушевская, Н. И. Авдюнина, Б. М. Пятин, Л. М. Гаева,
А. С. Михеева, В. И. Прокофьева, Е. В. Блынская**

*Научно-исследовательский институт фармакологии им. В. В. Закусова, Москва,
Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова*

Задача настоящего исследования состояла в разработке и валидации методики количественного определения кемантана в таблетках методом газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ-ПИД). Хроматографическое разделение проводили на кварцевой капиллярной колонке — WCOT Fused Silica CP-WAX 52 CB: 50 м, 0,32 мм, 1,2 мкм. Определены параметры пригодности хроматографической системы и факторы устойчивости методики. Разработанная методика валидирована, проведен анализ нескольких серий образцов таблеток кемантана.

Ключевые слова: кемантан, таблетки, 5-гидроксиадамantan-2-он, количественный анализ, валидация, газо-жидкостная хроматография.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ASSAY FOR KEMANTANE TABLETS BY GAS LIQUID CHROMATOGRAPHY

**A. V. Tolkacheva, L. N. Grushevskaya, N. I. Avdyunina, B. M. Pyatin, L. M. Gaevaya,
A. S. Miheeva, V. I. Prokofeva, E. V. Blinskaya**

The objective of this study was to develop and to validate a new assay of the active ingredient in Kemantane tablets by GC-FID. Chromatographic separation was performed on the fused silica capillary column - WCOT Fused Silica CP-WAX 52 CB: 50 m, 0,32mm, 1,2 μ m. Parameters of the chromatographic system suitability and robustness of the technique were determined. The developed technique was validated; several serial samples of Kemantane tablets 100 mg were analyzed.

Key words: kemantane, tablets, 5-hydroxyadamantan-2-one, assay, validation, gas liquid chromatography, GLC.

Кемантан (5-гидроксиадамantan-2-он) по своей структуре представляет собой производное адамантана, обладающее выраженной фармакологической активностью. Показано, что кемантан обладает антипаркинсоническим, иммуноотропным действием, способностью устранять алкогольный абстинентный синдром, а также высокой цереброваскулярной активностью, усиливая кровоснабжение ишемизированного мозга [2, 3].

В ФГБУ «НИИ фармакологии им. В. В. Закусова» РАМН была создана лекарственная форма кемантана — таблетки дозировкой 100 мг. Ранее для количественного определения кемантана в таблетках применялся спектрофотометрический метод [1]. Однако разработанная методика обладала низкой чувствительностью и воспроизводимостью, в связи с чем было принято решение о разработке новой методики количественного определения с помощью метода газожидкостной хроматографии (ГЖХ).

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Разработать методику количественного определения кемантана в таблетках методом газо-жидкостной хроматографии и провести ее валидацию.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования являлись серийные образцы таблеток кемантана дозировкой 100 мг, разработанные и полученные в лаборатории технологии готовых лекарственных форм ФГБУ «НИИ фармакологии имени В. В. Закусова» РАМН.

В качестве свидетелей использовали образцы субстанции кемантана, а также образцы технологических примесей кемантана: адамантан-2,6-дион и адамантан-2-он. В качестве внутреннего стандарта использовали 1-адамантанэтанол (Aldrich Chem. Co.: CAS № 6240-11-5).

Методика количественного определения была разработана и валидирована на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором (Varian GC-450, Нидерланды) и автосамплером (Varian CombiPAL Autosampler, Нидерланды). Обработку сигнала и полученных результатов осуществляли при помощи программы Galaxie (Galaxie Chromatography Data System, версия 1.9.302.952).

Разделение проведено на кварцевой капиллярной колонке «CP-WAX 52CB» длиной 50 м и внутренним диаметром 0,32 мм с нанесенной неподвижной фазой — полиэтиленгликолем (толщина слоя 1,2 мкм) (CP-WAX 52CB, Varian, Нидерланды).

В качестве растворителя для подготовки проб использовали спирт этиловый, 95%-й.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований были выбраны следующие условия: температура испарителя — 220 °С, температура термостата — 200 °С, температура детектора — 230 °С, скорость газа-носителя (азот) — 5 мл/мин, скорость газа-поддува (азот) — 25 мл/мин, скорость водорода — 30 мл/мин, скорость воздуха — 300 мл/мин, деление потока — 1:40, объем пробы — 1 мкл.

Анализ модельных смесей кемантана, технологических примесей и внутреннего стандарта с концентрацией каждого из соединений 0,5 мг/мл показал, что в выбранных условиях происходит полное разделение исследуемых соединений (рис. 1).

На хроматограмме извлечения из плацебо, кроме пика растворителя, дополнительных пиков не наблюдалось.

С целью выбора рабочей концентрации кемантана в испытуемых растворах нами была изучена зависимость площади пика от концентрации растворов кемантана и внутреннего стандарта (1-адамантанэтанол).

Линейная зависимость и для растворов кемантана, и для растворов 1-адамантанэтанола, наблюдалась в интервале от 0,01 мг/мл до 1 мг/мл, значения коэффициентов корреляции составляли не менее 0,999 (рис. 2).

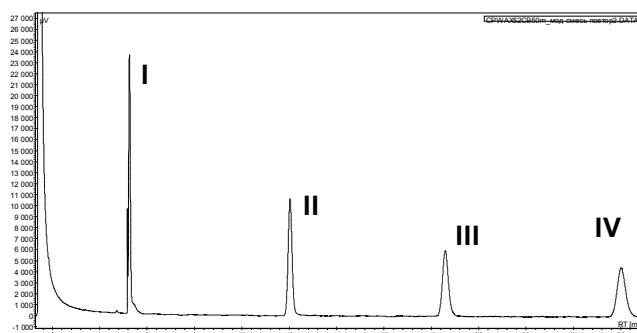


Рис. 1. Хроматограмма модельной смеси кемантана, технологических примесей и внутреннего стандарта:
I — адамантан-2-он, II — 1-адамантанэтанол,
III — адамантан-2,6-дион, IV — кемантан

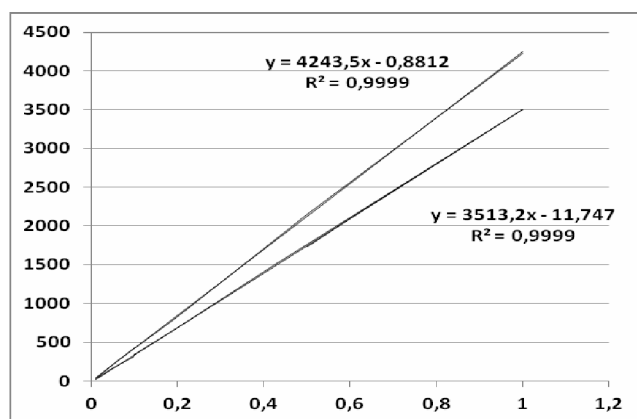


Рис. 2. Зависимость площади пика от концентрации растворов кемантана (I) и 1-адамантанэтанола (II)

Предел обнаружения кемантана — 0,00025 мкг, 1-адамантанэтанола — 0,000125 мкг. Предел количественного определения кемантана — 0,00125 мкг, 1-адамантанэтанола — 0,00025 мкг.

На основании полученных данных была выбрана рабочая концентрация для растворов кемантана и 1-адамантанэтанола (внутреннего стандарта) — 0,5 мг/мл.

Определение полноты извлечения кемантана из таблеточной массы проводили на модельных смесях субстанции кемантана и плацебо с содержанием вспомогательных веществ, аналогичным содержанию в таблетке, и с содержанием кемантана (100 ± 20) % от номинального.

Извлечение кемантана из таблеток проводили на ультразвуковой бане в течение 10 мин, к полученным пробам прибавляли раствор внутреннего стандарта, а затем фильтровали через фильтр «Миллипор» с диаметром пор 0,45 мкм. Параллельно готовили раствор для расчета поправочного коэффициента с концентрацией кемантана и 1-адамантанэтанола — 0,5 мг/мл.

Полученные растворы хроматографировали, получая не менее 3 хроматограмм каждого раствора, результаты усредняли.

Поправочный коэффициент вычисляли по следующей формуле:

$$K = \frac{S_{st} \times C_{кем}}{S_{кем} \times C_{st}},$$

где S_{st} — площадь пика внутреннего стандарта, мВ х мин; $S_{кем}$ — площадь пика кемантана, мВ х мин; C_{st} — концентрация раствора внутреннего стандарта, мг/мл; $C_{кем}$ — концентрация раствора кемантана, мг/мл.

Расчет содержания кемантана в модельном растворе (мг/мл) проводили по следующей формуле:

$$X = \frac{S_x \times K \times C_{st}}{S_{st}},$$

где S_x — площадь пика кемантана в испытуемом растворе, мВ х мин; S_{st} — площадь пика внутреннего стандарта в испытуемом растворе, мВ х мин; C_{st} — концентрация внутреннего стандарта в испытуемом растворе, мг/мл; K — поправочный коэффициент.

Полученные результаты представлены в табл.

Результаты анализа модельных растворов показали, что относительная ошибка однократного опреде-

Результаты количественного определения кемантана в модельных растворах методом ГЖ

Взято кемантана, мг/мл	Найдено, мг/мл	Абсолютная ошибка однократного определения	Относительная ошибка однократного определения, %	Метрологические характеристики, P = 95 %	Найдено в среднем, %	Метрологические характеристики, P = 95 %, n = 9
0,405	0,414 0,416 0,404 0,404	+0,009 +0,011 - 0,001 - 0,001	2,22 2,72 0,25 0,25	$\bar{X} = 0,410$ $S = 0,0064$ $\Delta\bar{X} = 0,0102$ $\bar{\varepsilon} = 2,49 \%$	101,23	$\bar{X} (\%) = 100,65$ $S = 1,000825$ $S_{\bar{X}} = 0,333608$ $\Delta\bar{X} = 0,77 \%$ $\bar{\varepsilon} = 0,77 \%$
0,427	0,429 0,428 0,431	+0,002 +0,001 +0,004	0,47 0,23 0,94	$\bar{X} = 0,429$ $S = 0,00153$ $\Delta\bar{X} = 0,00380$ $\bar{\varepsilon} = 0,89 \%$	100,47	
0,451	0,451 0,455 0,459	0 +0,004 +0,008	0 0,89 1,77	$\bar{X} = 0,455$ $S = 0,0040$ $\Delta\bar{X} = 0,00993$ $\bar{\varepsilon} = 2,18 \%$	100,89	
0,475	0,480 0,475 0,476	+0,005 0 +0,001	1,05 0 0,21	$\bar{X} = 0,477$ $S = 0,00265$ $\Delta\bar{X} = 0,00380$ $\bar{\varepsilon} = 0,80 \%$	100,42	
0,500	0,490 0,493 0,497	-0,010 -0,007 -0,003	2,00 1,40 0,60	$\bar{X} = 0,493$ $S = 0,00351$ $\Delta\bar{X} = 0,00871$ $\bar{\varepsilon} = 1,77 \%$	98,6	
0,527	0,530 0,530 0,526	+0,003 +0,003 -0,001	0,57 0,57 0,19	$\bar{X} = 0,529$ $S = 0,002345$ $\Delta\bar{X} = 0,005822$ $\bar{\varepsilon} = 1,10 \%$	100,38	
0,552	0,553 0,555 0,563	+0,001 +0,003 +0,011	0,18 0,54 1,99	$\bar{X} = 0,557$ $S = 0,00529$ $\Delta\bar{X} = 0,01313$ $\bar{\varepsilon} = 2,36 \%$	100,91	
0,575	0,582 0,591 0,593	+0,007 +0,016 +0,018	1,22 2,78 3,13	$\bar{X} = 0,589$ $S = 0,00586$ $\Delta\bar{X} = 0,01455$ $\bar{\varepsilon} = 2,47$	102,43	
0,605	0,614 0,611 0,602 0,604	+0,009 +0,006 -0,003 -0,001	1,49 0,99 0,50 0,17	$\bar{X} = 0,608$ $S = 0,00568$ $\Delta\bar{X} = 0,00903$ $\bar{\varepsilon} = 1,49 \%$	100,50	

ления количественного содержания кемантана методом ГЖХ не превышает 2,72 %.

Отклонение среднего результата измерения от истинного значения не превышало 2,43 %.

Ошибка методики — 0,77 %. Разброс данных: $(100,65 \pm 0,77)$ %.

Проверку пригодности хроматографической системы проводили путем хроматографирования раствора кемантана и 1-адамantanэтанолa с концентрацией каждого из соединений 0,5 мг/мл, по относительному времени удерживания пика кемантана относительно пика внутреннего стандарта $2,15 \pm 0,02$; числу теоретических тарелок (не менее 10000); фактору асимметрии (не более 2,0) и относительному стандартному отклонению площади пика кемантана (не более 2 %).

Изменение температуры термостата в пределах $\pm 10^\circ\text{C}$ и скорости газа-носителя в пределах $\pm 0,5$ мл/мин значительного влияния на разрешение и форму пиков исследуемых соединений не оказывало.

Определение количественного содержания кемантана в таблетках было проведено на пяти серийных образцах.

Испытуемые растворы готовили следующим образом: около 0,1 г (точная навеска) порошка растертых таблеток вносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, добавляли 7 мл спирта этилового 95%-го и помещали на ультразвуковую баню на 10 минут. Затем объем раствора доводили до метки тем же растворителем и тщательно перемешивали. 1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, куда предварительно вносили 5 мл спиртового раствора внутреннего стандарта (1-адамantanэтанолa) с концентрацией 1 мг/мл. Доводили объем раствора до метки тем же растворителем, перемешивали и фильтровали через фильтр «Миллипор» с диаметром пор 0,45 мкм (концентрация кемантана 0,5 мг/мл). Параллельно готовили раствор для расчета поправочного коэффициента. Получали не менее 5 хроматограмм каждого раствора.

Формула расчета содержания кемантана в таблетках (г/табл.):

$$X = \frac{K \times S_x \times C_{st} \times m_{\text{табл.}} \times V}{S_{st} \times m_{\text{навески}}},$$

где $m_{\text{табл.}}$ — средняя масса таблетки, г; $m_{\text{навески}}$ — масса навески таблеточной массы, г; S_x — площадь

пика кемантана в испытуемом растворе, мВ $\times$ мин; S_{st} — площадь пика внутреннего стандарта в испытуемом растворе, мВ $\times$ мин; C_{st} — концентрация внутреннего стандарта в испытуемом растворе, мг/мл; V — объем разведения навески таблеточной массы, мл; K — коэффициент пересчета.

Содержание кемантана в таблетках составляло от 0,0971 до 0,1042 г в таблетке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами была разработана методика количественного определения кемантана в таблетках с помощью ГЖХ. Разработанная методика специфична и обладает высокой чувствительностью. На модельных смесях проведена оценка правильности, прецизионности и устойчивости методики. Показано, что извлечение кемантана из таблеточной массы происходит практически полностью, отклонение среднего результата измерения от истинного значения не превышает 2,7 %. Ошибка методики — 0,77 %. Изменение температуры термостата в пределах $\pm 10^\circ\text{C}$ и скорости газа-носителя в пределах $\pm 0,5$ мл/мин значительного влияния на разрешение и форму пиков исследуемых соединений не оказывает.

С помощью разработанной методики проведено количественное определение кемантана в таблетках. Показано, что качество таблеток по этому показателю соответствует требованиям Государственной Фармакопеи СССР XI издания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кисляк Н. А. Создание твердых дозированных лекарственных форм производных адамантана: автореф. дис. ... канд. фарм. наук. — М., 1989.
2. Масленников Д. В., Авдюнина Н. И., Пятин Б. М. // Тез. докл. IV съезда фармакологов России. — Казань, 2012. — С. 129.
3. Мирзоян Р. С., Ганьшина Т. С., Масленников Д. В. и др. // Эксперим. и клин. фармакол. — 2012. — № 75 (6). — С. 27—30.

Контактная информация

Толкачева Анна Валентиновна — м. н. с. ОТО ФГБУ «НИИ фармакологии имени В. В. Закусова», аспирант кафедры фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, e-mail: av-tolkacheva@rambler.ru