

Рекомендована д. біол. наук, проф. Л. С. Фірою

УДК 543.422.3.062:615.453.6.074:615.214.24

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ЦИКЛОДОЛУ В ТАБЛЕТКАХ

© С. Л. Загородній¹, С. О. Васюк²

¹ Науково-дослідний експертно-криміналістичний центр при ГУМВС України в Запорізькій області

² Запорізький державний медичний університет

Резюме: розроблено нову спектрофотометричну методику кількісного визначення циклодолу на основі його взаємодії з бромкрезоловим зеленим у середовищі ацетону і вимірюванні абсорбції продукту реакції у видимій ділянці спектра при довжині хвилі 410 нм. Запропоновану методику застосовано для кількісного визначення циклодолу у лікарській формі – таблетках, вироблених українським фармацевтичним підприємством. Визначені основні валідаційні характеристики за Державною фармакопеею України. За отриманими експериментальними даними методика може бути коректно відтворена та придатна для використання в лабораторіях Державної інспекції з контролю якості лікарських засобів, а також ВТК хіміко-фармацевтичних підприємств і криміналістичних лабораторіях.

Ключові слова: спектрофотометрія, циклодол, бромкрезоловий зелений, кількісне визначення.

Вступ. Циклодол є одним з найпоширеніших представників синтетичних холінолітичних препаратів, що застосовуються для лікування паркінсонізму. Він володіє вираженою центральною м- та н-холінолітичною, а також периферичною м-холінолітичною дією. У хворих на паркінсонізм циклодол зменшує тремор, слиновиділення та потовиділення. Важливою особливістю циклодолу є його сильний вплив на центральну нервову систему, що при передозуванні зумовлює психічне та рухове збудження, галюцинації [1]. Терапевтична активність циклодолу та невисока ціна забезпечують йому популярність серед виробників фармацевтичних препаратів та хворих. Крім цього, виражена дія на центральну нервову систему призвела до поширення випадків зловживання циклодолом у немедичних цілях. Зокрема відомо, що циклодол є найпопулярнішим серед наркоманів галюциногеном на пострадянському просторі [2]. Зважаючи на вищевказане, забезпечення контролю якості лікарських форм, що містять циклодол, залишається актуальною проблемою для сучасного фармацевтичного аналізу [3, 4], а криміналістичний хімічний аналіз потребує простих та надійних методів кількісного аналізу циклодолу у лікарських формах та інших матрицях. Вирішити це питання можливо шляхом розробки нових доступних та високочувливих методик кількісного визначення даної речовини.

Для кількісного визначення циклодолу Європейська фармакопея пропонує використовувати метод потенціометричного кислотно-основного титрування [5]. У літературі також описані

методику кількісного визначення циклодолу у біологічних рідинах, які ґрунтуються на використанні високоефективної рідинної хроматографії, що характеризуються високою селективністю, але потребують складного дорогого обладнання та дорогих розчинників високого ступеня чистоти [6, 7]. Відомі методики кількісного аналізу циклодолу у біологічних рідинах за допомогою газової хроматографії, недоліком яких є тривалий час аналізу [8, 9, 10], а також капілярного електрофорезу [11, 12], що використовують прилади з дорогими витратними матеріалами. Відомо також кілька методик спектрометричного визначення циклодолу, які базуються на вимірюванні оптичної густини розчину циклодолу у суміші метанолу та 0,1 М хлороводневої кислоти (9:1) при довжині хвилі 206 нм [13], але їх недоліком є невисока селективність.

Мета роботи – розробка зручної, економічної, високочувливої спектрофотометричної методики кількісного визначення циклодолу у лікарських формах на основі реакції з бромкрезоловим зеленим (БКЗ) та валідація опрацьованої методики.

Для реалізації цієї мети були поставлені такі завдання:

- визначити оптимальні умови фотометричної реакції циклодолу з БКЗ і розрахувати аналітичні показники чутливості реакції;
- встановити коефіцієнти стехіометричних співвідношень «циклодол – БКЗ»;
- розробити методику кількісного визначення циклодолу в складі лікарської форми;

• провести валідацію розробленої методики з метою доведення її коректності та придатності для виконання запланованих завдань.

Методи дослідження. Для проведення дослідження було використано робочий стандартний зразок циклодолу гідрохлориду та лікарський засіб – таблетки «Циклодол» 0,002 г (ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ», Україна) серійний № 40207.

Як реактив та розчинник використали бромкрезоловий зелений (БКЗ) (SynexPharma, Китай, партія 20081101), ацетон (Lab-Scan, Poch Ірландія, партія 4164/11).

Аналітичне обладнання: спектрофотометр Specord 200, ваги електронні АВТ-120-5DM, мірний посуд класу А.

Загальна методика кількісного визначення циклодолу гідрохлориду

Циклодолу гідрохлорид розчиняють у ацетоні, для покращення розчинення до розчину додають 1 % етилового спирту. Аліквотну частину (0,00028 г) ацетонового розчину циклодолу вміщують в мірну колбу ємністю 10 мл, обробляють 1 мл 1,6 % ацетонового розчину БКЗ та перемішують. Абсорбцію досліджуваного розчину вимірюють на тлі компенсаційного розчину, що не містить досліджуваної речовини, при 410 нм.

Кількісне визначення циклодолу в таблетках

Точну наважку таблеткової маси в склянці на 25 мл розчиняють протягом 3–5 хв у суміші 0,25 мл етилового спирту та 3 мл ацетону, фільтрують отриманий розчин у мірну колбу ємністю 25 мл, склянку ополіскують двома порціями ацетону по 2 мл, які теж переносять на фільтр, фільтр додатково промивають 2 мл ацетону двічі, доводять отриманий розчин до позначки тим самим розчинником і перемішують. 1 мл одержаного розчину переносять у мірну колбу ємністю 10 мл

і аналізують за загальною методикою. Розрахунок вмісту діючої речовини проводять за типовою формулою.

Результати й обговорення. Аналітичне застосування сульфоталеїнових барвників відоме для кількісного визначення препаратів різних фармакологічних та хімічних груп. Це зумовлено здатністю кислотних форм реагентів утворювати комплекси з переносом заряду з речовинами, що містять у своїй структурі основний атом азоту.

На підготовчому етапі дослідження було встановлено, що циклодол має основний центр в молекулі, що надає йому можливість утворювати забарвлений продукт за реакцією з сульфоталеїновими барвниками.

Виходячи з даних про розчинність циклодолу та сульфоталеїнових барвників, було проведено підбір розчинника для даної реакції. Експериментально встановлено, що найбільш доцільним є використання як розчинника ацетону, але для покращення розчинності циклодолу гідрохлориду необхідно додавати 1 % за об'ємом етилового спирту. У такій кількості етиловий спирт забезпечує розчинність аналіту у межах концентрацій, необхідних за запропонованою методикою, і не впливає на перебіг реакції з реагентом. Як реагент вибрано бромкрезоловий зелений, оскільки він утворює з циклодолу гідрохлоридом найсильніше забарвлений та найстійкіший продукт реакції порівняно з іншими сульфоталеїновими барвниками.

Імовірно, в результаті реакції між циклодолом, що має надлишок електронної густини на атомі азоту, та БКЗ, що виступає донором протонів, утворюється комплекс із переносом заряду. Про це свідчить поява нової смуги поглинання при 410 нм, яка відсутня на спектрі реагенту (рис. 1).

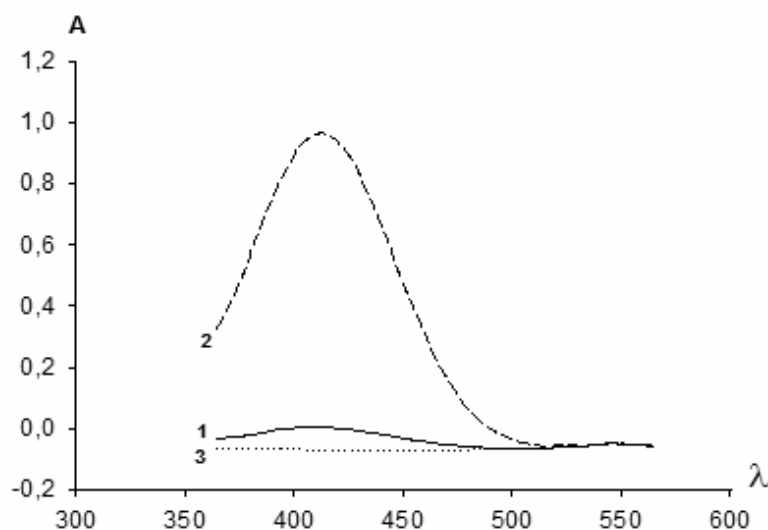


Рис. 1. Спектр поглинання БКЗ (1), продукту реакції циклодолу з БКЗ (2) та циклодолу (3).

Таким чином, БКЗ реагує з циклодолом у ацетоновому середовищі з утворенням забарвленого продукту жовтого кольору з максимумом світлопоглинання при 410 нм.

Оптимальну кількість регенту було обрано виходячи з максимального виходу продукту реакції. Температурний та часовий режими у даному випадку не потребували корекції – реакція перебігає швидко і при кімнатній температурі.

Розраховане значення молярного коефіцієнта, а саме $1 \cdot 10^4$, свідчить про високу чутливість реакції.

Для визначення співвідношення стехіометричних коефіцієнтів між циклодолом і БКЗ використовували метод молярних співвідношень (метод «насичення») і метод ізомолярних серій [14].

Як видно на рисунках 2 і 3, циклодол взаємодіє з БКЗ у співвідношенні 1:1.

Валідація аналітичної методики. Для забезпечення відтворюваності отриманих результатів і високої достовірності проведених аналізів, що гарантуватиме успішне застосування розробленої методики в системі контролю якості лікарських препаратів, введена процедура валідації аналітичних методик за вимогами ДФУ [14]. Далі проведена валідація розробленої методики за такими характеристиками, як лінійність, правильність, прецизійність, робастність.

Лінійність. Оптична густина спектрофотометрованого розчину знаходиться у лінійній залежності від концентрації досліджуваної речовини в межах 1,6-4,0 мг/100 мл. Вона підтверджена безпосередньо на активній субстанції (шляхом розведення вихідного розчину). Отримані результати, оброблені методом найменших квад-

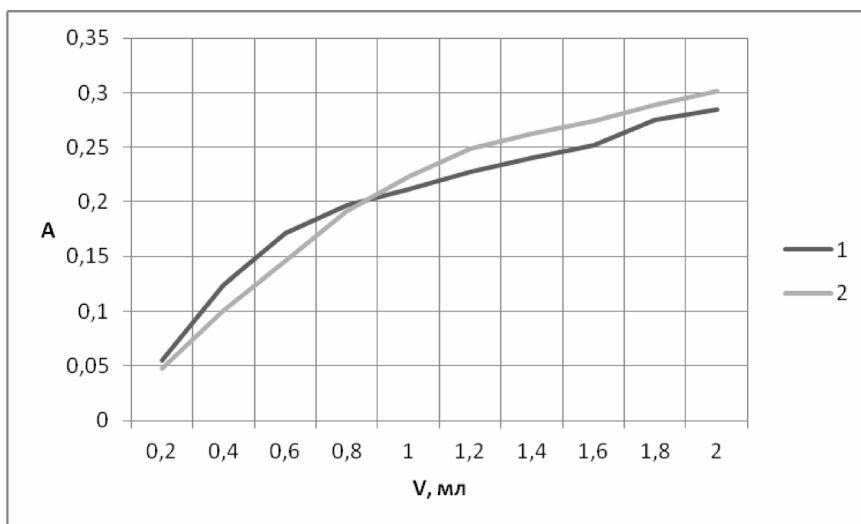


Рис. 2. Криві насичення БКЗ при постійній концентрації циклодолу (1) і циклодолу при постійній концентрації БКЗ (2).

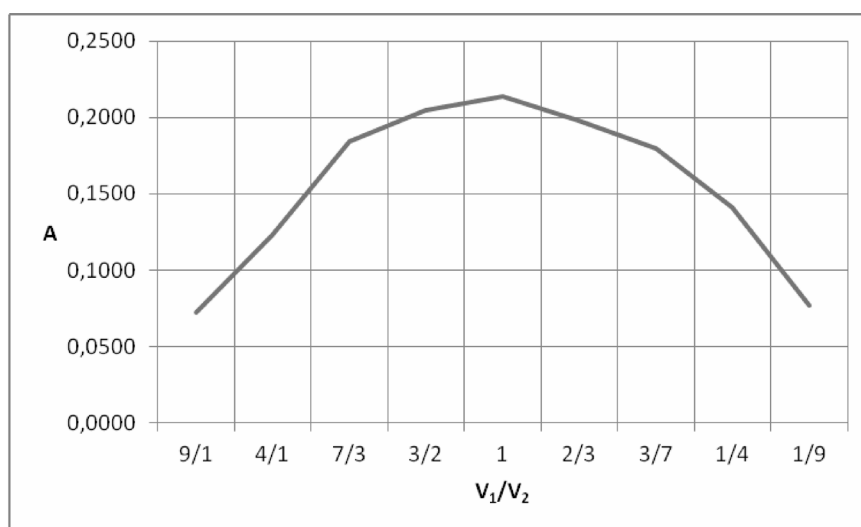


Рис. 3. Залежність величини оптичної густини від складу ізомолярного розчину (V₁ – 0,0005 М розчин БКЗ, V₂ – 0,0005 М розчин циклодолу).

ратів, свідчать про лінійність методики у всьому діапазоні її застосування.

Для лікарської форми – таблеток – лінійна залежність оптичної густини спектрофотометрованого розчину від концентрації досліджуваної речовини була підтверджена у межах концентрацій, що відповідають 80–120 % від номінального вмісту таблеток (рис. 4).

Основні показники лінійної залежності для таблеток «Циклодол» 0,002 г виробництва ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ» наведено у таблиці 1, з якої видно, що лінійність методики підтверджується у всьому діапазоні концентрацій, зазначених вище.

Прецизійність. Прецизійність методики визначали для лікарської форми – таблеток на рівні збіжності. Для цього в кожному випадку проводили дев'ять паралельних визначень (три наважки, три повтори), а за результатами розра-

ховували метрологічні характеристики (табл. 2). Як видно з таблиці 2, розроблена методика дозволяє отримувати результати зі збіжністю, достатньою для надійного визначення досліджуваної речовини в складі лікарських препаратів.

Правильність. Правильність методики визначали методом добавок. Для цього до розчину мінімальної наважки лікарського засобу тричі додавали три різні порції розчину робочого стандартного зразка циклодолу. Таким чином, отримували по три розчини трьох концентрацій циклодолу, що лежать у межах підпорядкування основному закону Бера. Далі вимірювали оптичну густину одержаних розчинів. Отримані результати визначень можна вважати правильними, тому що систематична похибка статистично не відрізняється від нуля, тобто справжнє значення величини не виходить за межі встановленого довірчого інтервалу (табл. 3).

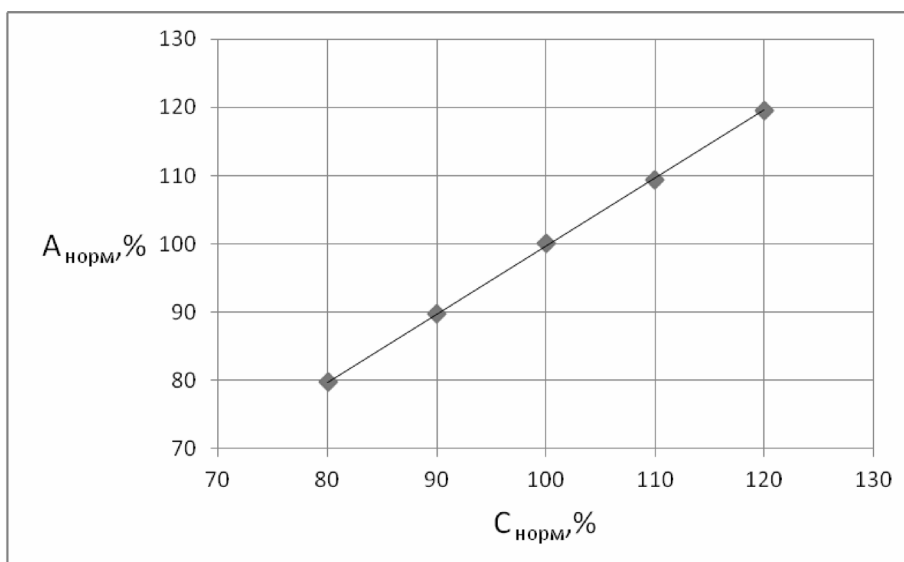


Рис. 4. Залежність величини оптичної густини від концентрації циклодолу у розчині таблеток.

Таблиця 1. Основні параметри лінійної залежності для лікарської форми – таблеток

Величина	Значення	Критерії	Висновок
Вільний член регресійної прямої, $a \pm (s_a)$	0,1800±(0,9366)	$\leq \Delta a = 2,9806$	відповідає
Тангенс кута нахилу регресійної прямої, $b \pm (s_b)$	0,9950±(0,009290)	–	–
Залишкове стандартне відхилення $s_{x,0}(\%)$	0,2953	$\leq \Delta_{As}/t = 1,360$	відповідає
Коефіцієнт кореляції, r	0,9998	$\geq 0,9963$	відповідає

Таблиця 2. Визначення збіжності результатів кількісного визначення досліджуваних таблеток (n=9, p=0,95)

Номінальний вміст, мг	Метрологічні характеристики			
	\bar{X}	S	RSD	$\Delta_{x,r} \leq \Delta_{As}(\%)$
2,00	2,01	0,0344	1,7	3,16 < 3,20

Таблиця 3. Визначення правильності методики із застосуванням методу добавок (n=9, p=0,95)

Добавка, мг/100 мл	Знайдено, середнє, мг/100 мл	Метрологічні характеристики			
		\bar{x} , %	S	Δz , %	$ \bar{x} - 100 \leq \Delta z / \sqrt{n}$
0,560	0,554	99,42	0,8686	2,056	0,420 < 0,685
1,400	1,397				
1,960	1,952				

Робасність. Визначення робасності даної методики проводили на стадії розробки. Для цього визначали стабільність аналізованих розчинів у часі та вплив кількості доданих реагентів на результати визначення. Було встановлено, що досліджувані забарвлені розчини стійкі не менше 30 хв, а коливання кількості доданого реагенту в межах $\pm 10\%$ не впливають на величину оптичної густини.

Висновки. Вивчено умови фотометричних реакцій сульфоталеїнових барвників із циклодолом, обрано БКЗ у ацетоновому середовищі як оптимальний реагент для кількісного визна-

чення циклодолоу і розраховано аналітичні показники чутливості реакції.

Запропоновано точну, економічну та швидку спектрофотометричну методику кількісного визначення циклодолоу за реакцією з БКЗ.

Доведено, що розроблена методика кількісного визначення циклодолоу, застосована до лікарської форми за такими характеристиками, як лінійність, прецизійність, правильність та робасність є валідною, і може використовуватись у фармацевтичних та криміналістичних аналітичних лабораторіях.

Література

1. Машковский М. Д. Лекарственные средства / М. Д. Машковский. – М., 2000. – Т. 1. – 137 с.
2. Шайдукова Л. К. Классическая наркология / Л. К. Шайдукова. – Казань : Институт истории им. Ш. Марджани АН РТ, 2008. – 30 с.
3. Харкевич Д. А. Фармакология: учебник для студентов высших учебных заведений / Д. А. Харкевич. – изд. 6-е, перераб. и доп. – М. : ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 1999. – 661 с.
4. Компендиум 2008 – Лекарственные препараты / под ред. В. Н. Коваленко, А. П. Викторова. – К. : МОРИОН, 2008. – 2250 с.
5. European Pharmacopoeia. - 7-th edition – European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care. – 2010. – P. 3140.
6. Capka V. Simultaneous determination of enantiomers of structurally related anticholinergic analogs in human serum by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry with on-line sample cleanup / V. Capka, Yan Xu // Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. – 2001. – Vol. 762(2). – P. 181–192.
7. Capka V. Stereoselective determination of trihexyphenidyl in human serum by LC–ESI–MS / V. Capka, Yan Xu // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 1999. – Vol. 21(3). – P. 507–517.
8. Desage M. Quantitation of trihexyphenidyl from plasma using a mass-selective detector and electron-impact ionization / M. Desage, M. Rousseau-Tsangaris // Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. – 1991. – Vol. 571 (1-2). – P. 250–256.
9. Simultaneous determination of trihexyphenidyl, chlorpromazine and clozapine in blood by GC-MS / S. Q. Zheng, W. Wang, C. Liang [et al.] // Fa Yi Xue Za Zhi. – 2011. – Vol. 24 (4). – P. 271–274.
10. Kamal A. Hadidi. Development of a screening method for the most commonly abused anticholinergic drugs in Jordan; trihexyphenidyl, procyclidine and biperiden / Hadidi A. Kamal // Legal Medicine. – 2004. – Vol. 6 (4). – P. 233–241.
11. Hua Li. Stereoselective determination of trihexyphenidyl using carboxymethyl- β -cyclodextrin by capillary electrophoresis with field-amplified sample stacking / Li Hua, Wang Peng-hui, Li. Chao // Microchemical Journal. – 2008. – Vol. 89 (1). – P. 34–41.
12. Determination of drugs used as anti-Parkinson's disease drugs in urine and serum by capillary electrophoresis / G. Vargas, J. Havel, L. Babackova [et al.] // J. Capillary Electrophor. – 1998. – Vol. 5 (3-4). – P. 153–161.
13. Wate S. P. Simultaneous spectrophotometric estimation of haloperidol and trihexyphenidyl in tablets / S. P. Wate, A. A. Borkar // Indian J. Pharm. Sci. – 2010. – Vol. 72 (2). – P. 265–267.
14. Державна фармакопея України. – 1-ше вид. – Харків : Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – Доповнення 2. – 2008. – 620 с.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИКЛОДОЛА В ТАБЛЕТКАХ

С. Л. Загородний¹, С. А. Васюк²

¹ Научно-исследовательский экспертно-криминалистический центр при ГУМВД Украины в Запорожской области

² Запорожский государственный медицинский университет

Резюме: разработана новая спектрофотометрическая методика количественного определения циклодола на основании его реакции с бромкрезоловым зеленым в среде ацетона и измерении абсорбции продукта реакции в видимой области спектра при длине волны 410 нм. Предложенная методика применена для количественного определения циклодола в лекарственной форме – таблетках, производимых украинским фармацевтическим предприятием. Определены основные валидационные характеристики по Государственной фармакопее Украины. Согласно полученных экспериментальных данных, методика может быть корректно воспроизведена и пригодна для использования в лабораториях Государственной инспекции по контролю качества лекарственных средств, а также ОТК химико-фармацевтических предприятий и криминалистических лабораториях.

Ключевые слова: спектрофотометрия, циклодол, бромкрезоловый зеленый, количественное определение.

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF TRIHEXYPHENIDYL IN TABLETS

S. L. Zahorodniy¹, S. O. Vasyuk²

¹ Scientific and Research Forensic and Expert Center at the Ministry of Internal Affairs of Ukraine in Zaporizhzhya Region

² Zaporizhzhya State Medical University

Summary: a new spectrophotometric method of quantification of Trihexyphenidyl based on its interaction with bromocresol green in acetone solution and measuring the absorption of the reaction product in the visible spectrum at a wavelength of 410 nm. The method used to quantify Trihexyphenidyl in dosage form – tablets produced by Ukrainian pharmaceutical company. The basic characteristics validated by the State Pharmacopoeia of Ukraine. According to the obtained experimental data, the technique can be correctly reproduced and is suitable for use in pharmaceutical and forensic analytical laboratories.

Key words: spectrophotometry, Trihexyphenidyl, bromocresol green, quantification.

Отримано 07.11.14