

Рекомендована д. фармац. наук, доц. С. В. Суром
 УДК 615.31'792'757-185.074:54.062]-025.13
 DOI 10.11603/2312-0967.2018.2.9002

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ L-ТРИПТОФАНУ ТА ТІОТРИАЗОЛІНУ В МОДЕЛЬНІЙ СУМІШІ

© Л. І. Кучеренко^{1,2}, І. А. Мазур^{1,2}, С. О. Борсук², О. О. Портна^{1,2}

НВТ «Фарматрон»¹

Запорізький державний медичний університет²

borsuksergejj@gmail.com

Мета роботи. Розробка методів стандартизації модельної суміші, до складу якої входять L-триптофан та тіотриазолін у терапевтичному співвідношенні 4:1.

Матеріали і методи. У ході дослідження в лабораторних умовах виготовлено 6 серій модельної суміші L-триптофану та тіотриазоліну в співвідношенні 4:1 (вміст діючих речовин на одну таблетку 200 мг і 50 мг відповідно) та розроблено методику стандартизації їх одночасного визначення методом ВЕРХ.

Результати й обговорення. Проведено аналіз 6 серій модельної суміші (в кожній по 6 дослідів) за розробленою методикою ВЕРХ. У результаті дослідження визначили вміст L-триптофану, який становить від 197,2 до 204,9 мг, тіотриазоліну від 48,9 мг до 50,5 мг, що відповідає вимогам чинної нормативної документації.

Висновки. У ході роботи розроблено високочутливий, відтворюваний, надійний, високоточний метод одночасної стандартизації діючих речовин, який планується використовувати при поетапному контролі якості таблеток з L-триптофаном та тіотриазоліном.

Ключові слова: L-триптофан; тіотриазолін; комбіновані лікарські засоби; модельна суміш; високоефективна рідинна хроматографія.

Вступ. Стан психічного здоров'я тісно пов'язаний з розвитком деяких захворювань, зниженням якості життя, зростанням інвалідності, а, як наслідок, і до збільшення смертності населення [1]. Дані Всесвітньої організації охорони здоров'я показують, що через перенесений стрес виникає 45 % усіх патологій людського організму, інші фахівці вважають, що ця цифра вдвічі вища [2]. Розробка і впровадження у виробництво нових вітчизняних препаратів для лікування ЦНС дозволить підвищити ефективність терапії психічних розладів та захворювань центральної нервової системи і стане наступним кроком на шляху до вирішення проблеми імпортозаміщення.

На сьогодні особливим попитом при лікуванні, а також профілактиці вищезазначених патологій із боку ЦНС користуються анксиолітичні та стрес-протекторні лікарські засоби. Серед даних препаратів на особливу увагу заслуговує структурний аналог нейротрансмітерів – L-триптофан. Дана незамінна амінокислота сприяє зняттю тривожності, синдрому хронічної втоми, підвищує настрій, усуває напругу і відчуття страху, покращує хороше засинання і нормалізує сон. Але даний лікарський засіб не має ноотропної, стреспротективної та антиоксидантної дії при самостійному застосуванні, а також має ряд побічних ефектів: сухість ротової порожнини, сонливість, зниження апетиту [3].

У зв'язку з цим, особливий інтерес становить потенціювання протекторних властивостей L-триптофану, а також нівелювання його побічних ефектів за рахунок комбінування з речовинами, які проявляють антиоксидантну дію і гальмують оксидативний стрес і тим самим відновлюють чутливість рецепторів нейрона, покращують енергозабезпечення головного мозку. До таких препаратів можна впевнено віднести антиоксидант, створений під керівництвом проф. І. А. Мазура – тіотриазолін [4].

Тому було поставлено завдання розробити комбінований лікарський засіб L-триптофану та тіотриазоліну, який буде мати високу анксиолітичну, а також антиоксидантну активності і додатково проявляти стрес-протекторну і ноотропну дії [5].

На попередньому етапі досліджень спільно з фармакологами було проведено підбір оптимального співвідношення діючих речовин. У ході роботи досліджували комбінації триптофану та тіотриазоліну – 1:1, 2:1, 4:1, 5:1, 7:1 в умовах тесту «підвішування за хвіст». У результаті проведених досліджень встановлено, що найбільш активною є комбінація триптофану і тіотриазоліну в співвідношенні 4:1 [6]. Тому для розробки методики кількісного визначення модельної суміші взято саме це співвідношення діючих речовин.

Мета роботи – розробка методик стандартизації модельної суміші, до складу якої входять L-триптофан та тіотриазолін у терапевтичному співвідношенні 4:1.

Матеріали і методи. У ході роботи ми використали субстанції L-триптофану (виробник – Sigma-Aldrich, США, серія 00120797U) і тіотриазоліну (виробник – Державне підприємство «Завод хімічних реактивів» Науково-технологічного комплексу «Інститут монокристалів» НАН України, серія 2341112). В якості робочих стандартних зразків використали стандартизовані робочі стандартні зразки L-триптофану фірми Sigma-Aldrich з вмістом 99,95 % і тіотриазоліну виробництва Державного підприємства «Завод хімічних реактивів» Науково-технологічного комплексу «Інститут монокристалів» НАН України з вмістом 100 %.

Для визначення діючих речовин у комбінованих готових лікарських формах найчастіше використовують метод ВЕРХ, який дозволяє одночасно ідентифікувати і кількісно визначити діючі речовини в лікарській формі. Виходячи з вище зазначеного, а також із фізико-хімічних властивостей діючих речовин, для виконання поставленої мети ми обрали метод ВЕРХ [7, 8, 9].

Першим етапом розробки методики було дослідження хроматографічної поведінки компонентів модельної суміші L-триптофану та тіотриазоліну (1:1), в результаті підбрано елюент і колонка, за допомогою якої в певних умовах можливо провести одночасну ідентифікацію та кількісне визначення як L-триптофану, так і тіотриазоліну. Таким чином, для кількісного визначення діючих речовин у модельній суміші було запропоновано використовувати наступні умови:

– колонка Prontosil Eurobond C 18 розміром 250×4,6 мл, з діаметром часток 5 мкм чи аналогічну, для якої виконуються вимоги тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи»;

– елюент: 20 % метанолу – 80 % фосфатного буферу, що містить 0,68 г/л дигідрофосфату калію та фосфатну кислоту (рН 3);

- швидкість рухомої фази 1 мл/хв.;
- довжина хвилі детектування 220 нм;
- об'єм введеної проби 10 мкл;
- температура термостату колонки + 25°C.

Результати й обговорення. Для стандартизації діючих речовин у модельній суміші L-триптофану та тіотриазоліну (4:1) ми використовували метод ВЕРХ. У ході дослідження ми провели аналіз 6 серій модельної суміші виготовлених в лабораторних умовах. На кожній серії модельної суміші проводили 6 дослідів [10, 11]. Дослідження проводили відповідно до розробленої методики ВЕРХ для ідентифікації та кількісного визначення діючих речовин у модельній суміші, яка наведена нижче.

Досліджуваний розчин. 250 мг (точна наважка) модельної суміші (4:1) розчиняють в 10 мл води в мірній колбі на 25,0 мл і доводять водою до мітки. 5,0 мл отриманого розчину поміщають в мірну колбу на 50,0 мл і доводять водою до мітки.

У ході дослідження робочого розчину модельної суміші L-триптофану та тіотриазоліну (4:1), утримуваний об'єм тіотриазоліну в цих умовах близько 2,13 мл, L-триптофану близько 4,0 мл. Коефіцієнт розподілу піків дорівнює 8. Хроматографування проводили в умовах, що наведені вище.

Приклад хроматограми робочого розчину модельної суміші L-триптофану з тіотриазоліном (4:1) наведено на рисунку 1.

Розчин порівняння (стандартний розчин). 200 мг (точна наважка) С3 L-триптофану та 50 мг (точна наважка) С3 тіотриазоліну розчиняють в 10 мл води в мірній колбі на 25,0 мл і доводять водою до мітки. 5,0 мл отриманого розчину поміщають в мірну колбу на 50,0 мл і доводять водою до мітки.

Розчин застосовується відразу після приготування.

Приклад хроматограми стандартного розчину модельної суміші L-триптофану з тіотриазоліном (4:1) наведено на рисунку 2.

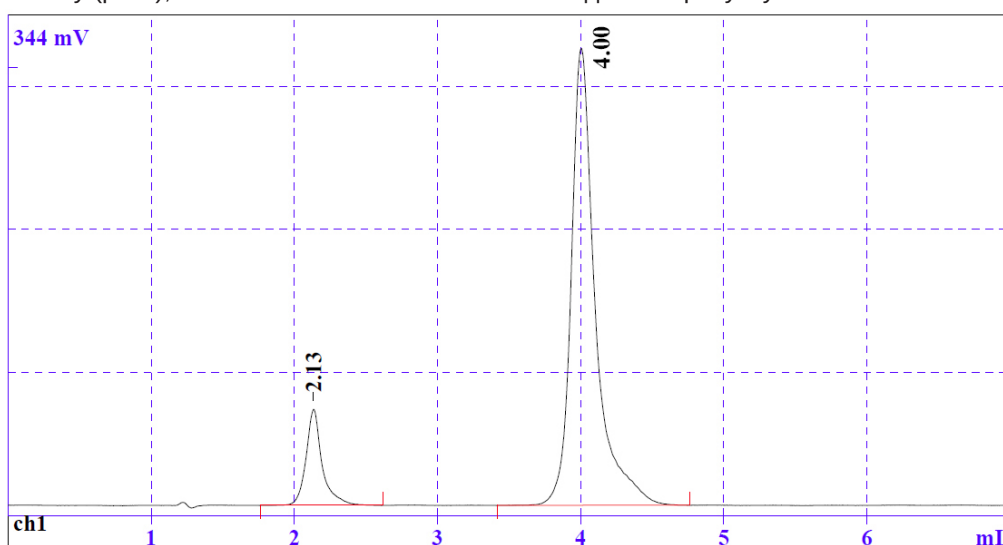


Рис. 1. Хроматограма робочого розчину модельної суміші L-триптофану та тіотриазоліну (4:1).

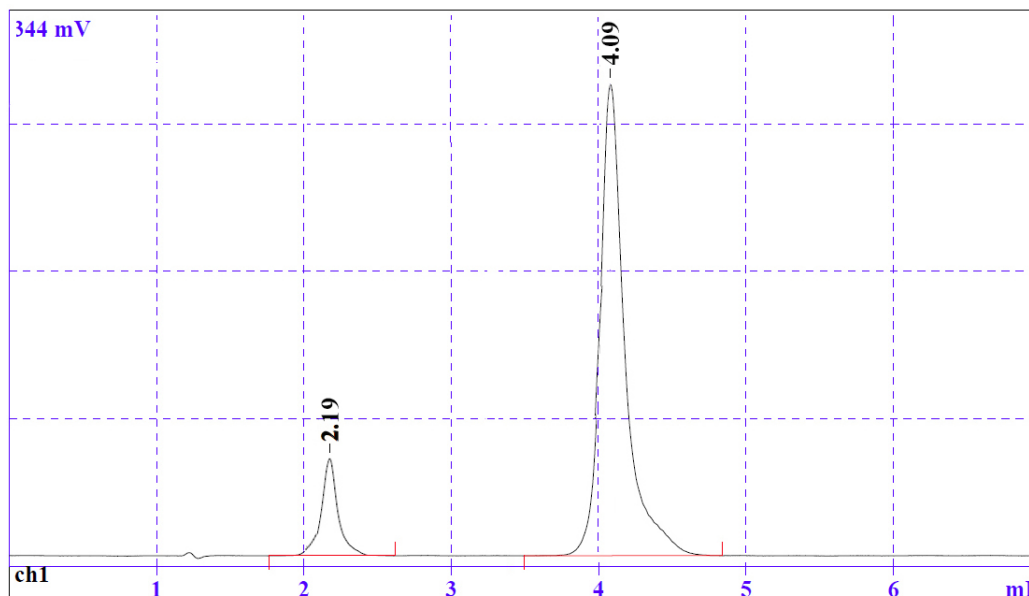


Рис. 2. Хроматограма робочого стандартного розчину модельної суміші L-триптофану та тіотриазоліну (4:1).

Вміст L-триптофану та тіотриазоліну (X) в модельній суміші, у міліграмах, розраховували за формулою:

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 25 \cdot 50 \cdot 5 \cdot b \cdot P}{S_0 \cdot m_1 \cdot 5 \cdot 25 \cdot 50 \cdot 100} = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot b \cdot P}{S_0 \cdot m_1 \cdot 100}$$

де S_1 – середнє значення площі піків L-триптофану (тіотриазоліну), розрахований з хроматограми досліджуваного розчину;

S_0 – середнє значення площі піків L-триптофану (тіотриазоліну), розрахований з хроматограми розчину порівняння;

m_1 – маса наважки модельної суміші, у міліграмах;
 m_0 – маса наважки СЗ L-триптофану (тіотриазоліну), у міліграмах;

P – вміст діючої речовини у СЗ L-триптофану (тіотриазоліну), у відсотках (вміст L-триптофану в СЗ 99,95 %, тіотриазоліну – 100 %);

b – середня маса діючих речовини у перерахунку на одну таблетку (250 мг).

Результати проведених досліджень, кількісного вмісту діючих речовин модельної суміші (4:1) серії 1 наведено в таблиці 1.

Таблиця 1. Результати кількісного визначення модельної суміші L-триптофану та тіотриазоліну (4:1) методом ВЕРХ (серія 1)

| № з/п | L-триптофан | | | | Тіотриазолін | | | |
|-------|-------------|--------------------|--------------|--|--------------|--------------------|--------------|--|
| | Площа піка | середня площа піка | знайдено, мг | статистика | площа піка | середня площа піка | знайдено, мг | статистика |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 1 | 68086,747 | 69337,384 | 201,5 | $\bar{x} = 201,12$ $S_x = 0,59$ $t(0,95) = 2,02$ | 23559,274 | 23712,700 | 48,9 | $\bar{x} = 49,52$ $S_x = 0,44$ $t(0,95) = 2,02$ |
| | 70015,757 | | | | 23947,947 | | | |
| | 69909,648 | | | | 23630,879 | | | |
| 2 | 69915,535 | 69543,847 | 202,1 | $\Delta x = 1,19$ $\bar{x} \pm \Delta x =$ $\Delta x = 0,48$ | 23440,253 | 23378,412 | 49,2 | $\Delta x = 0,89$ $\bar{x} \pm \Delta x =$ $\Delta x = 0,36$ |
| | 70471,633 | | | | 23316,571 | | | |
| | 68244,373 | | | | 23378,412 | | | |
| 3 | 70135,336 | 69096,509 | 200,8 | $\bar{x} \pm \Delta x =$ $201,12 \pm 0,48$ $e^x = 0,24\%$ | 23746,794 | 23883,946 | 49,4 | $\bar{x} \pm \Delta x =$ $49,52 \pm 0,36$ $e^x = 0,73\%$ |
| | 68044,470 | | | | 24021,097 | | | |
| | 69109,721 | | | | 23883,947 | | | |
| 4 | 69473,260 | 69062,099 | 200,7 | | 24248,490 | 24052,147 | 49,6 | |
| | 69209,019 | | | | 24197,173 | | | |
| | 68504,018 | | | | 23710,778 | | | |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|----|-----------|-----------|-------|---|-----------|-----------|------|---|
| 5 | 68494,979 | 69199,742 | 201,1 | | 24335,211 | 24270,361 | 50,1 | |
| | 68991,530 | | | | 23991,644 | | | |
| | 70088,717 | | | | 24464,228 | | | |
| 6 | 68374,039 | 68993,278 | 200,5 | | 24324,324 | 24197,623 | 49,9 | |
| | 69332,694 | | | | 24125,192 | | | |
| | 69273,101 | | | | 24143,353 | | | |
| CP | 68520,927 | 68821,225 | | | 24424,238 | 24246,115 | | |
| | 68875,500 | | | | 24069,453 | | | |
| | 69067,248 | | | | 24244,655 | | | |

За вище вказаною методикою ми проаналізували усі приготовані в лабораторних умовах серії модельної суміші. В ході роботи визначили вміст L-триптофану, який знаходиться в межах від 197,2 до 204,9 мг, тіотриазоліну – від 48,9 мг до 50,5 мг. Згідно з вимогами Державної фармакопеї України вміст L-триптофану в таблетках повинен бути не менше 190 мг і не більше 210,0 мг, тіотриазоліну – не менше 47,5 мг і не більше

52,5 мг [12]. Як видно з вищенаведених даних, отримані результати відповідають усім вимогам ДФУ.

Висновки. У ході роботи розроблено високочувливий, відтворюваний, надійний, високоточний метод визначення L-триптофану та тіотриазоліну при спільній присутності, який планується використовувати при постадійному контролі якості таблеток L-триптофану з тіотриазоліном.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ L-ТРИПТОФАНА И ТИОТРИАЗОЛИНА В МОДЕЛЬНОЙ СМЕСИ

Л. И. Кучеренко^{1,2}, И. А. Мазур^{1,2}, С. А. Борсук², Е. А. Портна^{1,2}

НПО «Фарматрон»¹

Запорожский государственный медицинский университет²

borsuksergejjj@gmail.com

Цель работы. Разработка методов стандартизации модельной смеси, в состав которой входят L-триптофан и тиотриазолин в терапевтическом соотношении 4:1.

Материалы и методы. В ходе исследования в лабораторных условиях изготовлено 6 серий модельной смеси L-триптофана и тиотриазолина в соотношении 4:1 (содержание действующих веществ на одну таблетку 200 мг и 50 мг соответственно) и разработана методика стандартизации их одновременного определения методом ВЭЖХ.

Результаты и обсуждение. Проведен анализ 6 серий модельной смеси (в каждой по 6 опытов) по разработанной методике ВЭЖХ. В результате исследования определили содержание L-триптофана, который составляет от 197,2 до 204,9 мг, тиотриазолина от 48,9 до 50,5 мг, что соответствует требованиям действующей нормативной документации.

Выводы. В ходе работы разработан высокочувствительный, воспроизводимый, надежный, высокоточный метод одновременной стандартизации действующих веществ, который планируется использовать при постадийном контроле качества таблеток с L-триптофаном и тиотриазолином.

Ключевые слова: L-триптофан; тиотриазолин; комбинированные лекарственные средства; модельная смесь; высокоэффективная жидкостная хроматография.

ON THE L-TRYPTOPHAN AND THIOTRIAZOLINE QUANTITATION IN MODEL MIXTURE

L. I. Kucherenko^{1,2}, I. A. Mazur^{1,2}, S. A. Borsuk², E. A. Portna^{1,2}

RPA «Farmatron»¹

Zaporizhzhia State Medical University²

borsuksergejjj@gmail.com

The aim of the work. To develop standardization methods the model mixture, which consists of L-tryptophan and thiotriazoline in the therapeutic ratio 4:1.

Materials and Methods. During the study, 6 series of the model mixture of L-tryptophan and thiotriazoline in a ratio of 4:1 (the active ingredient content per tablet 200 mg and 50 mg respectively) were prepared in the laboratory and was developed the standardization method for their simultaneous determination by HPLC.

Results and Discussion. An analysis of 6 series of a model mixture (in each of 6 experiments) was carried out according to the developed HPLC method. As a result of the study, we have determined the content of L-tryptophan, which is from 197.2 mg to 204.9 mg, thiotriazoline from 48.9 mg to 50.5 mg, that meets the requirements of the current normative documentation.

Results. In the course of work, we have developed a high-sensitivity, reproducible, reliable, high-precision method of simultaneous standardization of active substances, which is planned to be used for the stage-by-stage control of the quality of L-tryptophan and thiotriazoline tablets.

Key words: L-tryptophan; thiotriazoline; fixed combination; model mixture; high-performance liquid chromatography.

Список літератури

1. Неврозы и стресс / Ю. А. Фесенко, Л. П. Чурилов, В. А. Худик та ін. – СПб. : Фолиант, 2018. – 352 с.
2. Воробьева О. В. Стресс и антистрессовая терапия / О. В. Воробьева, И. В. Рябоконт // Лечащий врач. – 2011. – Т. 5. – С. 85–89.
3. Коваленко В. Н. Компендиум. Лекарственные препараты / В. Н. Коваленко – К. : Морион, – 2013. – 2320 с.
4. Мазур И. А. Тиотриазолин / И. А. Мазур, Н. А. Волошин, И. С. Чекман. – Запорожье, Львов : Наутилус, 2005. – 156 с.
5. Пат. на винахід № а201604961, Україна. Комбінований лікарський засіб анксиолітичної, стрес-протективної, ноотропної, антиоксидантної дії / Кучеренко Л. І., Борсук С. О., Бєленічев І. Ф. – заявл. 04.05.2016 ; опубл. 24.06.16. – Бюл. № 12.
6. Изучение фармакологических свойств нового комбинированного лекарственного средства триптофана с тиотриазолином / Л. И. Кучеренко, И.Ф. Бєленічев, И. А. Мазур [и др.] // Рецепт. – 2016. – Т. 19, № 6. – С. 696–703.
7. Георгиевский Г. В. Разработка комплекса физико-химических методик, обеспечивающих создание и контроль качества оригинальных отечественных препаратов, производных 1,2,4-триазола // Запорож. мед. журн. – 2011. – Т. 13, № 1. – С. 58–69.
8. Справочник хроматографиста. Методы жидкостной

- хроматографии / О. Б. Рудаков, И. А. Востров, С. В. Федоров и др. ; под ред. С. В. Селеменова. – Воронеж : Водолей, 2004. – 520 с.
9. Oiestad E. L. Drug screening of preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry / E. L. Oiestad, U. Johansen, A. S. Christophersen // Clin. Chem. – 2007. – No. 53. – P. 300–309.
10. Підбір оптимальних умов аналізу штучної суміші ізоніазиду та тиотриазоліну методом високоефективної рідинної хроматографії / Л. І. Кучеренко, О. В. Хромільова, З. Б. Мор'як, Г. І. Ткаченко // Запорож. мед. журн. – 2014. – № 2. – С. 118–120.
11. Щодо сумісного визначення карбамазепіну та тиотриазоліну в модельній суміші методом ВЕРХ. Повідомлення 1: підбір фази для сумісного визначення карбамазепіну та тиотриазоліну у модельній суміші методом ВЕРХ / Л. І. Кучеренко, Г. Р. Німенко, О. В. Ващенко, В. В. Ващенко // Фармац. часоп. – 2016. – № 1. – С. 54–58.
12. Державна фармакопея України: в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-ге вид. – Х. : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 1. – 1128 с.

References

1. Fesenko YA, Churilov LP, Hudik VA. Neurosis and stress. [Неврозы и стресс] SPb: Foliant; 2018. Russian.
2. Vorobeva OV, Ryabokon IV. [Stress and anti-stress therapy]. Lechashchiy vrach. 2011;5:85-9. Russian.
3. Kovalenko VN. Compendium. Medicines. [Компендиум. Лекарственные препараты] K: Morion; 2013. Russian.
4. Mazur IA, Voloshin NA, Chekman IS. Thiotriazoline [Тиотриазолин]. Zaporozhe, Lvov: Nautilus; 2005. Russian.
5. Kucherenko LI, Borsuk SO, Belenichev IF. Combined anxiolytic, stress-protective, nootropic, antioxidant drug; UA a201604961 (Patent) 2016 Jun 24. Ukrainian.
6. Kucherenko LI, Belenichev IF, Mazur IA. [A study of the pharmacological properties of a new combined tryptophan with thiotriazoline]. Retsept. 2016;19(6): 696-703. Russian.
7. Georgievskiy GV. [Development of a complex of physico-chemical methods that provide creation and control of the quality of original domestic preparations, derivatives of 1,2,4-triazole]. Zaporozh med zhurn. 2011;1: 58-69. Russian.
8. Rudakov OB, Vostrov IA, Fedorov SV. Directory chromatographer. Methods of liquid chromatography.

- [Справочник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии] Voronezh: Vodoley; 2004. Russian.
9. Oiestad EL, Johansen U, Christophersen AS. Drug screening of preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Clin Chem. 2007;53: 300-9.
10. Kucherenko LI, Hromilova OV, Moryak ZB, Tkachenko GI. [Selection of optimal conditions for the analysis of an artificial mixture of isoniazid and thiotriazoline by high performance liquid chromatography]. Zaporozh. med. zhurn. 2014;2: 118-20. Ukrainian.
11. Kucherenko LI, Nimenko HR, Vashchenko OV, Vashchenko VV. [Carbamazepine and thiotriazoline simultaneous definition in model mixture by HPLC. Message 1: phase selection for the simultaneous determination of carbamazepine and thiotriazolin in model mixture by high performance liquid chromatography]. Farmatsevt chasop. 2016;1: 54-8. Ukrainian.
12. State Pharmacopoeia of Ukraine. 2 vyd. [Державна Фармакопея України. 2 вид.] Kh: Derzhavne pidpriemstvo "Ukrainskyi naukovyi farmakopeynyi tsentr yakosti likarskikh zasobiv"; 2015. Ukrainian.

Отримано 13.04.2014