

Г.В. Георгієвський

## РОЗРОБКА МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ 1-(β-ФЕНІЛЕТІЛ)-4-АМІНО-1,2,4-ТРИАЗОЛІЮ БРОМІДУ У 0,2% РОЗЧИНІ ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ

ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», м. Харків

**Ключові слова:** високоефективна рідинна хроматографія, валідація, фармацевтична розробка, 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію бромід.

**Ключевые слова:** высокоэффективная жидкостная хроматография, валидация, фармацевтическая разработка, 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолия бромид.

**Key words:** HPLC, validation, pharmaceutical development, 1-(β-phenylethyl)-4-amino-1,2,4-thiazolyl bromide.

Доведено можливість застосування методики високоефективної рідинної хроматографії для розробки методики кількісного визначення 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду в 0,2% розчині для ін'єкцій. Методика провалідована, що дозволяє застосовувати її в контролі якості ін'єкційних лікарських форм.

Доказана можливість застосування методики високоефективної жидкостной хроматографии для разработки методики количественного определения 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолия бромида в 0,2% растворе для инъекций. Методика валидирована, что позволяет применять ее в контроле качества инъекционных лекарственных форм.

The suitability of HPLC method for the development of the procedure for quantification of 1-(β-phenylethyl)-4-amino-1,2,4-thiazolyl bromide in a 0.2 % solution for injection has been proved. The procedure was validated, so it may be used for the quality control of injectable dosage forms.

Клінічне застосування створених під керівництвом професора І.А. Мазура [1,3–5] препаратів для лікування хвороб кровообігу – тіотріазоліну та кардіотрилу – визначило їх місце в арсеналі лікарських засобів, особливо в лікуванні інфаркту міокарда. Однак ці препарати не мають швидкого та вираженого кардіопротекторного ефекту в найгостріший і гострий період, що ускладнює їх застосування при інтенсивній терапії серцево-судинних захворювань, не має антигіпертонічної та ендотеліопротекторної дії. Тому синтезовано субстанцію, похідну 1,2,4-тріазолу-1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію бромід, що при доклінічних дослідженнях за антигіпертензивною дією перевищує ефективність засобів базової терапії (аналогу за фармакологічною дією карведіолу і прототипу кардіотрилу). Найефективнішою лікарською формою для досягнення максимального ефекту дії визначено водний ін'єкційний розчин [3].

### МЕТА РОБОТИ

Наведено шляхи вирішення проблеми розробки методики кількісного визначення субстанції 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду в ін'єкційній формі.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Хроматографічне визначення проводили на ВЕРХ-хроматографі LC-20 Shimadzu, за таких умов:

- колонка Zorbax SB C18 розміром 250×4,6 мм, заповнена сорбентом з розміром частинок 5 мкм, або аналогічна;
- рухома фаза: ацетонітрил – буферний розчин (15:85), дегазована у будь-який зручний спосіб;
- швидкість рухомої фази – 1,0 мл/хв;
- температура колонки – 30°C;
- довжина хвилі детектування – 254 нм.

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження фізико-хімічних властивостей похідних 1,2,4-тріазолу [2,6,7] дозволили розробити наступну методику:

*Приготування випробовуваного розчину:* 5,0 мл розчи-

ну препарату поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, доводять об'єм розчину рухомою фазою до позначки та перемішують.

*Приготування розчину порівняння:* 0,050 г (точна навеска) СЗ 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду поміщають у мірну колбу місткістю 250 мл, розчиняють у 100 мл рухомої фази, доводять об'єм розчину водою до позначки та перемішують.

*Приготування буферного розчину:* 5,0 г натрію гексансульфонату, 5,0 г літію перхлорату поміщають у мірну колбу місткістю 1000 мл, розчиняють у 800 мл води, доводять об'єм розчину водою до позначки та перемішують. Доводять рН отриманого розчину до 2,5 фосфорною кислотою концентрованою (потенціометрично, ДФУ, 2.2.3).

10 мкл випробовуваного розчину і 10 мкл розчину СЗ 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду хроматографують на рідинному хроматографі за наведених умов.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо:

- ефективність хроматографічної системи, розрахована за піком 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду, становить не менше 2000 т.т. (2.2.46);
- відносне стандартне відхилення, розраховане для площ піків 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду має становити 0,51% для 2 паралельних визначень, 1,34% для 3 паралельних визначень, 1,92% для 4 паралельних визначень;
- асиметрія хроматографічного піку 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду має становити не більше 1,7.

Вміст 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду, у грамах у мілілітрі, обчислюють за формулою:

$$\frac{S \times m_o \times 50}{S_o \times 250 \times 5} = \frac{S \times m_o \times 0,04}{S_o}$$

де  $S$  – середнє значення площ піків 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду, обчислене з хроматограм

випробовуваного розчину;  $S_o$  – середнє значення площ піків 1-( $\beta$ -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду, обчислене з хроматограм розчину СЗ 1-( $\beta$ -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду;  $m_o$  – маса наважки СЗ 1-( $\beta$ -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду, у грамах.

Кількісний вміст 1-( $\beta$ -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду в 1 мл препарату має становити від 0,018 г до 0,022 г.

Валідацію методики кількісного визначення 1-( $\beta$ -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду в розчині для ін'єкцій проведено відповідно до вимог ІСН щодо валідації методик ВЕРХ [International Conference of Harmonization, Validation of Analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1). www.ich.org].

*Селективність (специфічність)*

Для перевірки селективності методики приготовано та проаналізовано такі розчини: розчин стандартного зразка 1-( $\beta$ -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду, випробовуваний розчин препарату та розчин плацебо. Хроматограми, отримані при дослідженні розчинів, наведено на *рис. 1-3*. Як можна побачити, на хроматограмі розчину плацебо немає додаткових піків, що можуть заважати визначенню 1-( $\beta$ -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду.

*Лінійність, межі визначення*

Для визначення лінійності методики, межі кількісного визначення та межі детектування приготовано та проаналізовано 5 розчинів 1-( $\beta$ -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду. На основі отриманих даних (*табл. 1*) розраховано параметри порівняння лінійної регресії, коефіцієнт кореляції та межі кількісного визначення та детектування.

Таблиця 1

**Залежність площі піку від концентрації 1-( $\beta$ -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду**

Концентрація 1-( $\beta$ -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду, мкг/мл	Площа піку 1-( $\beta$ -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду
4,04	228053
4,04	235710
4,04	232900
4,04	231799
4,04	236181
12,1	352729
12,1	349491
12,1	357794
12,1	358801
12,1	349896
20,2	469371
20,2	471590
20,2	472170
20,2	466385
20,2	467119
28,3	590417
28,3	591765
28,3	591432
28,3	589785
28,3	593147
40,4	781476
40,4	783136
40,4	783870
40,4	786954
40,4	786016

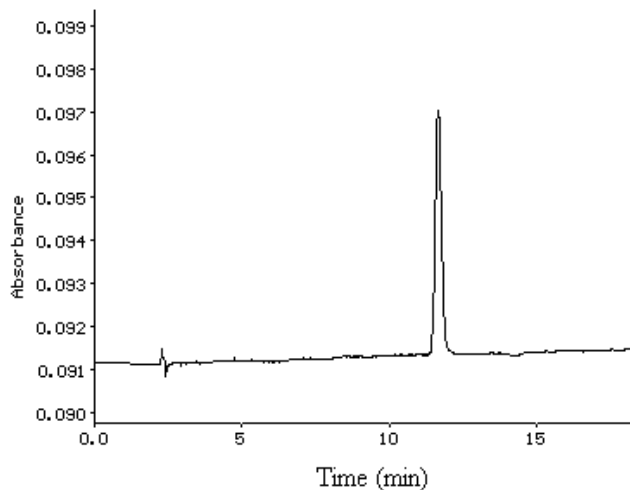


Рис. 1. Хроматограма розчину СЗ 1-( $\beta$ -фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду.

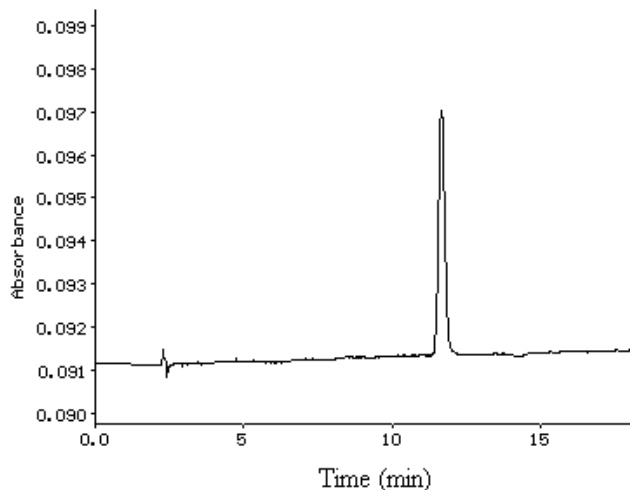


Рис. 2. Хроматограма випробовуваного розчину препарату.

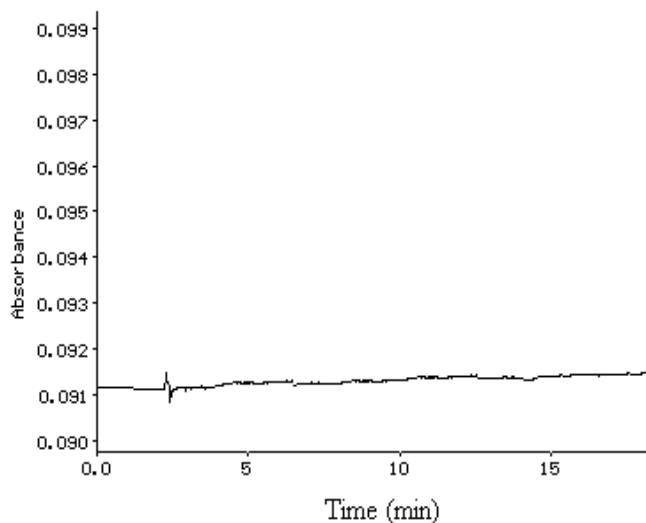


Рис. 3. Хроматограма розчину плацебо.

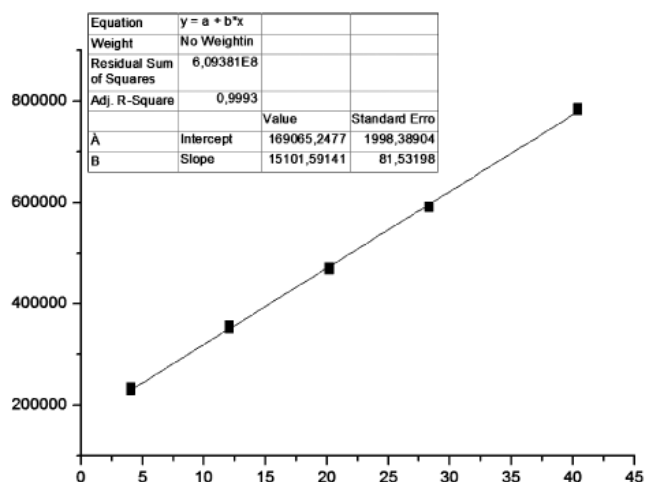


Рис. 4. Графік лінійної залежності площі піку від концентрації 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду.

На рис. 4 наведено графіки лінійної залежності площі піку від концентрації 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду, параметри рівняння лінійної залежності та коефіцієнт кореляції.

Межа кількісного визначення становить 0,44 мкг/мл. Межа детектування – 1,32 мкг/мл.

**Правильність**

Правильність методики перевірено методом «введено-знайдено». Для цього приготовано 3 розчини стандартного зразка з різною концентрацією 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду. Кожен розчин проаналізовано 5 разів. Результати визначення (середні значення з трьох паралельних визначень) наведено в таблиці 2.

**Точність і відтворюваність**

Для визначення точності методу кількісного визначення тричі хроматографували розчини з концентраціями 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду 50%, 100% і

150% від теоретичного вмісту 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду у препараті. На основі отриманих даних обчислювали кількість 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду.

Для визначення відтворюваності методики протягом трьох діб готували й аналізували розчини 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду, обчислюючи його вміст від теоретичного.

Результати наведено в таблиці 3.

**ВИСНОВКИ**

1. Розроблено та впроваджено методику кількісного визначення 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду в 0,2% розчині для ін'єкцій.

2. Показано, що методика згідно до валідаційних показників може бути застосована в нормативно-аналітичній документації при виконанні фармацевтичної розробки в створенні нового оригінального вітчизняного препарату.

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Мазур І.А. Метаболитотропные препараты / Мазур І.А., Чекман І.С., Беленичев І.Ф., Волошин Н.А. и др. – Запоріжжє, 2007. – 304 с.
2. Георгиевский Г.В. Аналитическое обеспечение синтеза и создания готовых лекарственных форм – производных 1,2,4-триазола / Георгиевский Г.В., Мазур І.А. // Українська Конференція з аналітичної хімії з міжнародною участю. Тези допов. – Одеса, 2008. – 178 с.
3. Пат. України № 79912. Спосіб одержання Бромід 1-(β-фенілетил)-4-(п-диметиламінобензиліденаміно)-1,2,4-тріазолію / Мазур І.А., Авраменко М.О., Кучеренко Л.І., Георгиевський Г.В. та ін.
4. Пат. на изобретение № 2404974 Российской Федерации. Бромид 1-(β фенилетил)-4-амино-1,2,4-триазолия (МТ), обладающий кардиопротективным, противоишемическим, антигипертензивным, антиоксидантным, протеинсинтетическим и энерготропным действием / Мазур І.А., Беленичев І.Ф., Колесник Ю.М., Кучеренко Л.І., Волошин Н.А., Абрамов А.В., Чекман І.С., Горчакова Н.А., Загородний М.І., Мамчур В.І., Довгань Р.С.
5. Пат. на винахід № 92692 України – Лікарський засіб для

Таблиця 2

**Результати визначення правильності методики методом «введено-знайдено»**

Вміст 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду,	Кількість 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду, мкг/мл «введено»	Кількість 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду, мкг/мл «знайдено»	Вміст 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-тріазолію броміду від введеного, %
50	12,10	12,09	99,9
100	20,20	20,21	100,05
150	30,30	30,29	99,98
Кількість паралельних визначень	n=	3	
Середнє значення	Xcp=	99,97	
Дисперсія	S²=	0,00823	
Відносне стандартне відхилення	Sr, %=	0,091	
Відносна похибка	(%)=	0,225	

Таблиця 3

**Точність і відтворюваність методики**

Теоретична концентрація, мкг/мл	Точність (як збіжність) Середнє, % ± RSD, %	Точність (як відтворюваність)		
		Відтворюваність, % ± RSD, %		
		доба 1	доба 2	доба 3
12,1	99,79±0,09	99,9±0,4	99,6±0,7	99,9±0,9
20,2	100,4±0,2	100,2±0,5	100,4±0,8	99,9±0,5
30,3	100,1±0,3	99,7±0,4	100,0±0,4	100,1±0,2



- лікування ішемічної хвороби серця та гіпертонічної хвороби/  
*Мазур І.А., Бєленічев І.Ф., Колесник Ю.М., Кучеренко Л.І.,  
Волошин М.О., Абрамов А.В., Чекман І.С., Горчакова Н.О.,  
Загородній М.І., Мамчур В.І, Довгань Р.С.*
6. *Георгиевский Г.В.* Разработка комплекса физико-химических методик, обеспечивающих создание и контроль качества оригинальных отечественных препаратов – производных 1,2,4-триазола / *Георгиевский Г.В.* // Запорізький медичний журнал. – 2011. – №1. – С. 58–70.
7. *Георгиевский Г.В.* Хроматографические методы анализа в синтезе и контроле качества новых отечественных препаратов – производных 1,2,4-триазола / *Георгиевский Г.В.* // Річна Сесія Наукової Ради з проблеми «Аналітична хімія» НАН України, 3–10 червня 2012 р., Гурзуф, АР Крим, Україна

**Відомості про автора:**

Георгієвський Г.В., ст. науковий співробітник відділу ДФУ, ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів».

Поступила в редакцію 05.10.2012 г.