

На правах рукописи

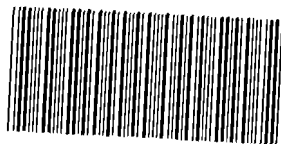
Шелехова

Шелехова Вера Александровна

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРА МЕДИБОРОЛА В
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ
СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ И
ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ**

Специальность 02.00.02 – аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук



005552905

25 СЕН 2014

Томск – 2014

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель: доктор фармацевтических наук, профессор
Краснов Ефим Авраамович

Официальные оппоненты: Онучак Людмила Артемовна
доктор химических наук, профессор,
ФГБОУ ВПО «Самарский государственный
университет», заведующий кафедрой физи-
ческой химии и хроматографии

Шелеметьева Ольга Владимировна, канди-
дат химических наук, ФБУ «Государствен-
ный региональный центр стандартизации,
метрологии и испытаний в Томской облас-
ти», начальник отдела инжиниринговых ус-
луг

Ведущая организация: ФГБОУ ВПО «Омский государственный
университет им. Ф.М. Достоевского»

Защита состоится «15» октября 2014 г. в 14 ч 30 мин
на заседании диссертационного совета Д 212.269.04 при ФГАОУ ВО
«Национальный исследовательский Томский политехнический универси-
тет» по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30, корпус 2, e-mail:
tvm@tpu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Нацио-
нальный исследовательский Томский политехнический университет» и на
сайте: <http://portal.tpu.ru/council/911/worklist>

Автореферат разослан «4» сентября 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета



Т.М. Гиндуллина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Проблема лечения и профилактики нарушений мозгового кровообращения имеет не только медицинское, но и важнейшее социальное значение во всем мире. В России заболеваемость инсультом неуклонно растет, а смертность от него устойчиво занимает второе место в структуре общей смертности населения, уступая только коронарной патологии и опережая опухоли всех локализаций.

Значительный рост частоты ишемического инсульта, приводящий к потере трудоспособности и частым летальным исходам, обуславливает актуальность создания и применения новых лекарственных препаратов для его лечения. В современном лечении нарушений мозгового кровообращения важное место занимают нейропротекторные средства, обеспечивающие метаболическую защиту головного мозга. Одним из основных направлений нейропротекторной терапии является применение антиоксидантов для уменьшения интенсивности свободно-радикального и перекисного окисления липидов. Таким свойством обладают соединения группы пространственно-затрудненных фенолов, в частности 2,6-дизоборнил-4-метилфенол, или медиборол. Данное соединение проявляет антирадикальную, антитромбогенную, гемореологическую, нейропротекторную, умеренную антигипоксическую активность в сочетании с низкой токсичностью.

Необходимым этапом на пути проведения клинических испытаний и дальнейшего внедрения в медицину медиборола является разработка методик анализа медиборола в лекарственных формах, обеспечивающих их качество, эффективность и безопасность. Кроме того, целесообразно оценить пригодность разрабатываемых аналитических методик для их применения. Одним из этапов исследования была разработка лекарственных форм медиборола, результаты которых приведены в Приложениях.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы заключается в изучении поведения медиборола при спектрофотометрии и жидкостной хроматографии и в разработке на их основе методик его определения в лекарственных препаратах.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Исследовать реакцию окисления медиборола с целью ее применения для идентификации медиборола в лекарственных препаратах.
2. Изучить спектральные характеристики медиборола в растворах растительных масел с использованием метода УФ-спектроскопии и разработать спектрофотометрическую методику определения содержания медиборола в масляных растворах.
3. Осуществить выбор условий и разработку методики хроматографического определения медиборола в растворах в масле для инъекций в

варианте обращенно-фазной высокoeffективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) со спектрофотометрическим детектированием.

4. Разработать методику количественного определения медиборола в суппозиториях.

5. Оценить метрологические характеристики методик количественного определения медиборола в лекарственных формах.

Поставленные задачи решались путем обобщения и критического рассмотрения имеющейся литературы и результатов собственных экспериментальных исследований.

Научная новизна. Впервые исследована реакция окисления медиборола со щелочным раствором гексацианоферрата (III) калия. С помощью физико-химических методов установлена структура конечного продукта реакции. Предложен способ идентификации медиборола в лекарственных препаратах на основе данной реакции с использованием метода тонкослойной хроматографии (ТСХ). Изучены спектральные характеристики медиборола в растворах оливкового и персикового масел с использованием метода УФ-спектроскопии. Установлены три аналитические длины волны для определения концентрации медиборола в каждом растворе на основе метода Фирордта. Подобраны рабочие хроматографические условия, позволяющие разделять медиборол и компоненты масел. Разработаны методики количественного определения медиборола в различных лекарственных формах с использованием методов УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ. Данные методики позволяют получать результаты с малой погрешностью.

Практическая значимость. Предложены доступные и простые методики определения нового биологически активного соединения – медиборола в лекарственных формах (раствор в масле для инъекций и суппозитории) для лечения инсульта. Данные методики не требуют дорогостоящих реактивов и позволяют получать результаты с требуемой точностью, что очень важно для практического массового применения в медицине. На основе проведенных исследований разработаны проекты фармакопейных статей предприятия (ФСП) на раствор медиборола в масле для инъекций и суппозиториях с медиборолом.

Связь задач исследования с планами научных работ. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научных исследований кафедры фармацевтической химии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России и комплексной целевой программой СО АМН Российской Федерации «Здоровье человека в Сибири» (номер государственной регистрации 01200602064).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Результаты исследования реакции окисления медиборола со щелочным раствором гексацианоферрата (III) калия и методика качествен-

ного определения медиборола в лекарственных формах на основе данной реакции.

2. Результаты изучения УФ-спектров поглощения медиборола в оливковом и персиковом маслах и методика количественного определения медиборола в растворах растительных масел на основе метода Фиордта.

3. Выбор рабочих условий и методика хроматографического определения медиборола в масляном растворе для инъекций с использованием изократического и градиентного элюирования.

4. Методика количественного определения медиборола в ректальной лекарственной форме.

5. Результаты валидации методик количественного определения медиборола в лекарственных формах.

Апробация и публикация результатов исследований. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на 67-й региональной конференции по фармации и фармакологии (Пятигорск, 2012); на VI Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Менделеев-2012» (Санкт-Петербург, 2012); на II Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2012); на 68-й научной конференции по фармации, фармакологии и подготовке провизоров «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции» (Пятигорск, 2013); на научных семинарах кафедры фармацевтической химии СибГМУ (Томск, 2011–2013).

По материалам диссертации опубликовано 10 работ, в том числе 7 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Экспериментальные исследования по теме диссертации выполнялись на кафедрах фармацевтической химии и фармацевтической технологии с курсом биотехнологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (г. Томск), а также в сотрудничестве с коллективами других научных организаций: ООО «Сибтест» Национального исследовательского Томского политехнического университета (г. Томск) и Пятигорского медико-фармацевтического института — филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России (г. Пятигорск).

Личный вклад автора. Основные экспериментальные результаты, приведенные в диссертации, получены самим автором или при его непосредственном участии. Автором выполнены исследования по установлению строения продукта реакции медиборола со щелочным раствором гексацианоферрата (III) калия, данная реакция предложена для идентификации медиборола в лекарственных формах, разработаны методики количественного определения медиборола в растворе для инъекций и в

суппозиториях методами ВЭЖХ и УФ-спектрофотометрии, составлены проекты ФСП на лекарственные формы медиборола. Автор проводил обработку, обобщение всех полученных результатов и формулировал основные выводы.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, трех глав экспериментальных исследований, выводов, приложений и списка цитируемой литературы. Материал изложен на 141 странице, включает 20 таблиц и 28 рисунков. Библиографический указатель – 169 наименований, из которых 68 зарубежных.

Во введении обоснована актуальность проблемы, определены цели и задачи исследования, приведены защищаемые положения. Первая глава представляет собой обзор литературы об общих сведениях пространственно-затрудненных фенолов. Изложены основные свойства экранированных фенолов, и дана характеристика современному состоянию физико-химических методов аналитического контроля данных соединений. Описание объекта исследования, используемой аппаратуры и методов проведения эксперимента приведено во второй главе. Третья глава посвящена исследованию реакции окисления медиборола со щелочным раствором гексацианоферрата (III) калия. Предложен алгоритм методики качественного определения медиборола в лекарственных формах на основе данной реакции. В четвертой главе проведены исследования по разработке методик количественного определения медиборола в лекарственных препаратах методами ВЭЖХ и УФ-спектроскопии. В заключении сделаны выводы. В Приложениях представлены обоснование состава и технологии получения таблеток и суппозиториях, содержащих медиборол; проект ФСП «Раствор медиборола в масле 2 % для инъекций» и проект ФСП «Свечи с медиборолом 0,05 г».

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Объект исследования, методы и аппаратура проведения эксперимента

В качестве объектов исследования использованы субстанция медиборола, синтезированная в Институте химии Коми научного центра Уральского отделения РАН, и лекарственные формы медиборола (раствор медиборола 2 %-й в масле для инъекций и суппозитории с медиборолом 0,05 г), полученные в ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. Данная субстанция медиборола представляет собой белый мелкокристаллический порошок со специфическим запахом и липофильными свойствами: практически не растворим в воде, очень мало растворим в 95 %-м этаноле, метаноле и ацетонитриле, мало растворим в изопропанол, умеренно растворим в ацетоне и диэтиловом эфире, растворим в диметилформамиде, легко растворим в хлороформе и тетрагидрометане. Раствор медиборола 2 %-м в масле для инъек-

ций представляет собой прозрачную маслянистую жидкость от светло-желтого до желтого цвета непрогорклого вкуса и запаха. Суппозитории с медиборолом 0,05 г получены на липофильной основе и по внешнему виду представляют собой свечи белого цвета, торпедообразной формы, на срезе однородные без механических включений.

УФ-спектры снимали на спектрофотометре СФ-2000-02 (Россия) в кварцевых кюветах (толщина поглощающего слоя 1 см). ИК-спектры получали на ИК-Фурье-спектрометре Nicolet 5700 (США) в диапазоне 4000–400 см⁻¹ в таблетках бромида калия.

Спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) ¹H и ¹³C регистрировали на ЯМР-Фурье-спектрометре AVANCE AV 300 (Bruker, Германия) при температуре 300 К и рабочей частоте 300 и 75 МГц соответственно. В качестве внутреннего стандарта использовали тетраметилсилан. Образцы готовили путем растворения вещества в дейтерохлороформе (CDCl₃). Элементный анализ выполняли на анализаторе CHNS, O «Vario EL Cube» (Elementar, Германия).

Хроматографирование в тонком слое выполняли в восходящем токе заданной системы растворителей гексан-этилацетат в объемном соотношении 95:5 при комнатной температуре в герметически закрытых стеклянных камерах, предварительно насыщенных заданной системой, используя хроматографические пластины «СилуфолУФ-254» (Чехия), «Сорбфил ПТСХ-АФ-УФ» и «Сорбфил ПТСХ-АФ-А» (Россия), TLC Silicagel 60 F254 (Merck, Германия). Нанесение растворов исследованных образцов на хроматографические пластины осуществляли при помощи калибровочной микропипетки. В качестве реактива для проявления пятен использовали смесь 1 %-го раствора гексацианоферрата (III) калия с 1 %-м раствором гидроксида калия в соотношении 4:1.

Исследования методом ВЭЖХ проводили на приборе Милихром А-02 (ЭкоНова, Россия), снабженном УФ-детектором и колонкой ProntoSIL-120-5-C-18 (5,0 мкм, размер 2,0x75 мм).

Определение показателей качества суппозиториев с медиборолом проводили по методикам Государственной фармакопеи (ГФ) XI издания, вып. 1 и 2, ОСТ 91500.05.001-00 «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения» и ОФС 42-0129-09 «Однородность дозирования».

2. Идентификация медиборола в лекарственных формах методом тонкослойной хроматографии

Учитывая пространственную затрудненность фенольного гидроксила в медибороле, не представляется возможным его обнаружение классическими химическими реакциями (образование азокрасителя и с раствором железа (III) хлорида). Но, по некоторым литературным данным (С.Д. Cook et al.), экранированные фенолы реагируют со щелочным рас-

твором гексацианоферрата (III) калия с образованием фенокисльных радикалов, которые на воздухе образуют окрашенные пероксиды. Данная реакция интересна для идентификации медиборола в лекарственных формах (растворы в масле для инъекций, суппозитории).

Для выделения продукта взаимодействия медиборола со щелочным раствором гексацианоферрата (III) калия и подтверждения его структуры была проведена реакция окисления согласно методике, приведенной в работах С.Д. Cook et al. (1953–1956). В результате был получен ярко-оранжевый порошок, выход продукта составил 61,9 % по отношению к массе медиборола.

Полученное соединение было исследовано с помощью физико-химических методов. Для ИК-спектра исследуемого вещества характерно наличие интенсивных полос поглощения в области $2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$, отвечающим валентным колебаниям С-Н-связей в $-\text{CH}_2-$ и CH_3- группах. В диапазоне $1340\text{--}1480\text{ см}^{-1}$ полосы поглощения соответствуют деформационным колебаниям С-Н-связи в этих группах. Полоса поглощения 1605 см^{-1} свидетельствует о наличии в структуре исследуемого вещества карбонильной группы ($\text{C}=\text{O}$), 1572 см^{-1} – о сопряженных двойных связях ($\text{C}=\text{C}$). Обертон валентных колебаний карбонильной группы лежит в области $3550\text{--}3200\text{ см}^{-1}$.

Согласно спектрам ЯМР ^1H и ^{13}C исследуемого вещества его структура представляет собой производное стильбенхинона. Отсутствие пероксидной группы подтверждалось качественной реакцией на данную группу с раствором иодида калия в кислой среде. Наличие двойных связей устанавливалось реакцией восстановления в присутствии разбавленной хлористоводородной кислоты и цинка. Полученные значения элементного анализа исследуемого вещества, %: С 85,60; Н 9,72; О 4,38 – соответствовали брутто-формуле $\text{C}_{54}\text{H}_{74}\text{O}_2$ (вычисленные соотношения, %: С 85,89; Н 9,88; О 4,23). Таким образом, продуктом реакции является 3,5,3',5'-тетраизоборнилстильбен-4,4'-хинон. Поэтому реакцию окисления медиборола со щелочным раствором гексацианоферрата (III) калия можно представить в виде схемы (рис. 1).

Данная реакция окисления была взята за основу для идентификации медиборола в лекарственных формах (раствор в масле для инъекций и суппозитории) методом ТСХ, который позволяет отделить определяемое вещество от компонентов лекарственных форм, препятствующих окислению медиборола.

В качестве системы растворителей предложена смесь гексана и этилацетата в объемном соотношении 95:5, достоинством которой является разделение медиборола и вспомогательных компонентов лекарственных форм. Щелочной раствор гексацианоферрата (III) калия был выбран для

проявления пятен медиборола на пластинках, так как он является специфичным по отношению к замещенным фенолам.

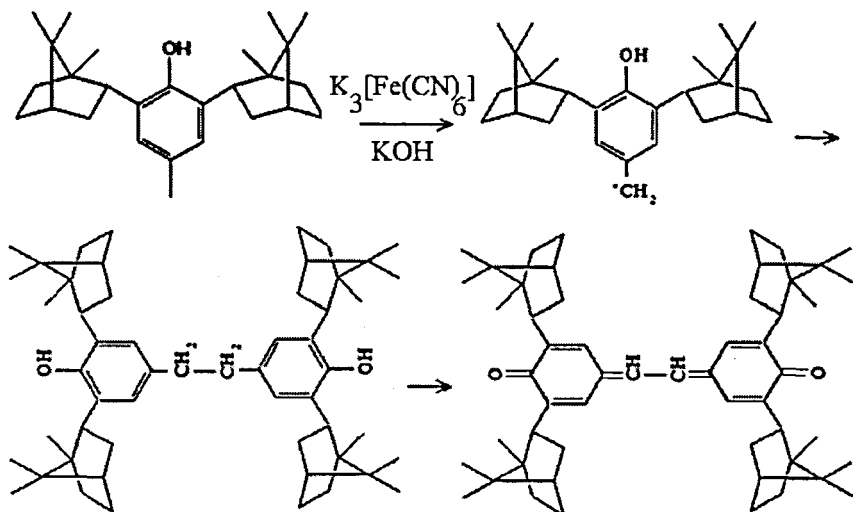


Рисунок 1 – Схема реакции медиборола со щелочным раствором калия гексацианоферрата (III)

Были подобраны оптимальные концентрации и соотношения компонентов проявителя. Наиболее интенсивное пятно медиборола наблюдалось при проявлении раствором 1 %-го гексацианоферрата (III) калия и 1 %-го гидроксида калия в соотношении 4:1. Для ускорения протекания реакции окисления медиборола, после проявления щелочным раствором гексацианоферрата (III) калия методом «погружения» пластинки нагревали в сушильном шкафу при температуре $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 5 мин. Кроме того, был определен предел обнаружения медиборола на различных пластинках с использованием подобранного проявителя. При этом наименьший предел обнаружения наблюдался при использовании пластинок «Сорбфил» двух марок, он составил 0,06 мкг.

Таким образом, разработанная методика идентификации обладает высокой чувствительностью и селективностью, что позволит контролировать качество выпускаемых препаратов медиборола в контрольно-аналитических лабораториях, а также выявлять фальсифицированные лекарственные средства.

3. Разработка методик количественного определения медиборола в лекарственных формах

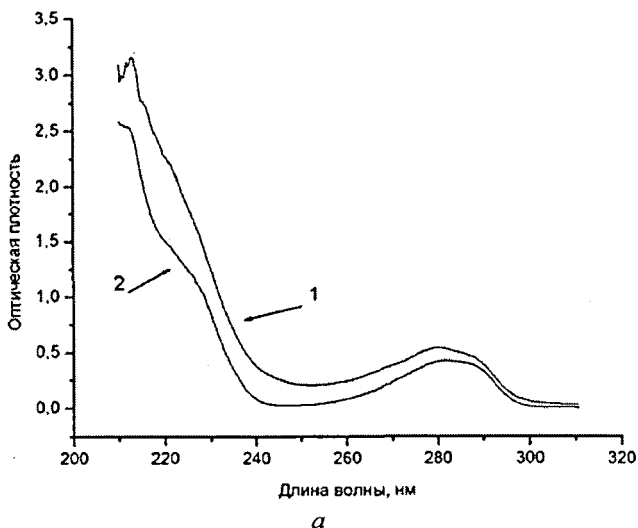
3.1. Спектрофотометрическое определение медиборола в масляных растворах

Для определения содержания медиборола в масляном растворе была разработана методика на основе спектрофотометрии.

Исследуемые растворы получали из 2 %-го масляного раствора медиборола путем однократной экстракции 95 %-м этанолом при температуре 80–85 °С в течение 15 мин. Кроме 95 %-го этанола, для экстракции медиборола из масляного раствора были исследованы другие растворители (метанол, ацетонитрил), которые не позволяли полностью экстрагировать медиборол из масляного раствора в отличие от 95 %-го этанола.

В УФ-области спектра медиборола в 95 %-м этиловом спирте присутствует максимум поглощения при длине волны (282±2) нм, но в этой области поглощают компоненты масла, которые переходят вместе с медиборолом при экстракции спиртом этиловым (рис. 2). Это приводит к завышенным результатам при количественном определении концентрации медиборола: (2,515±0,117) % и (3,065±0,198) % для растворов медиборола в оливковом и персиковом маслах соответственно.

Для устранения указанного недостатка был использован метод Фиордта и рассчитано содержание медиборола в масляном растворе при трех аналитических длинах волн, которые выбраны на линейном участке поглощения компонентов масла.



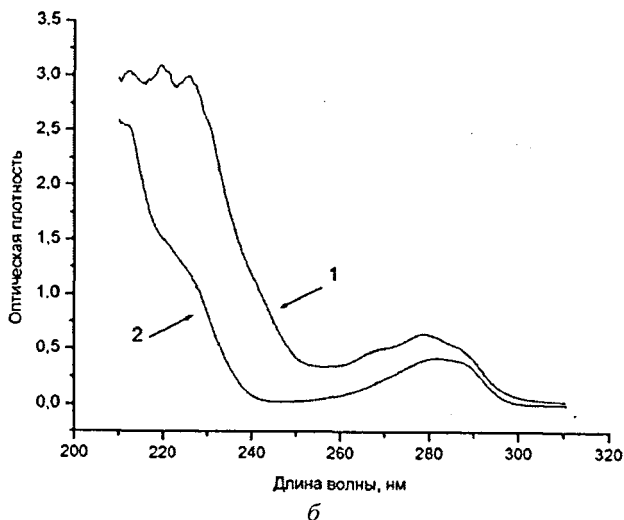
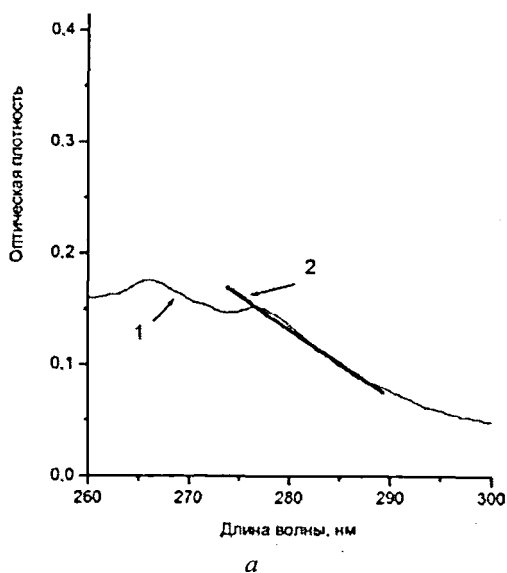


Рисунок 2 – Спектры поглощения этанольных экстрактов из 2 %-х растворов медиборола в оливковом (а) и персиковом (б) маслах (1), 0,006 %-го этанольного раствора медиборола (2)



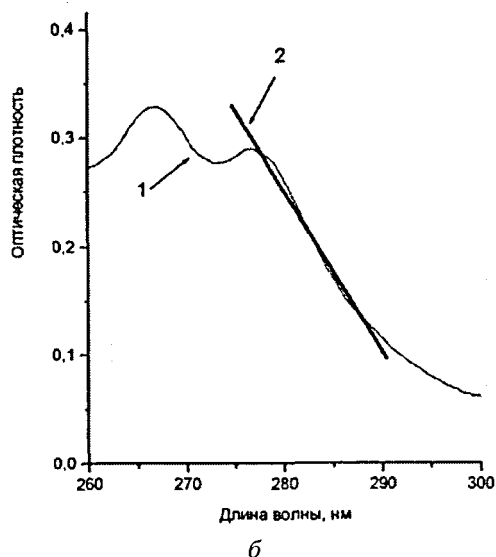


Рисунок 3 – Спектр поглощения этанольного экстракта оливкового (а) и персикового (б) масел (1), кривая наилучшей подгонки (2)

На рисунке 3 представлены спектры поглощения этанольных экстрактов оливкового и персикового масел, из которых видно, что в области длин волн от 275 до 290 нм спектр поглощения имеет приблизительно линейный вид для этанольных экстрактов оливкового и персикового масел. Среднеквадратическая ошибка отклонения спектра поглощения от линейной зависимости равна 0,0042 и 0,0118 для этанольных экстрактов оливкового и персикового масел соответственно. Для растворов медиборолы в оливковом масле аналитические длины волн были выбраны $\lambda_1=275$, $\lambda_2=284$ и $\lambda_3=288$ нм, а в персиковом - $\lambda_1=276$, $\lambda_2=283$ и $\lambda_3=289$ нм.

Применение метода Фирордта существенным образом повышает правильность измерения концентрации медиборолы в масляных растворах. При этом ошибка определения основного вещества составляет 0,85 % для раствора медиборолы в оливковом и 1,35% – в персиковом маслах. В качестве иллюстрации в таблице 1 приведены результаты определения содержания медиборолы в растворе оливкового масла с использованием метода Фирордта.

Для проведения валидации спектрофотометрической методики количественного определения медиборолы в растворах оливкового и персикового масел с использованием метода Фирордта и метода наименьших квадратов пробоподготовка была упрощена за счет исключения следую-

щих этапов работы: экстракция при нагревании и фильтрование. Она заключалась в растворении навесок масляного раствора медиборола в изопропиловом спирте.

Таблица 1 – Результаты количественного определения медиборола в растворе оливкового масла с использованием метода Фирордта

Масса навески, г	Оптическая плотность			Содержание медиборола в 1 мл масляного раствора, мг	Оценка погрешности определения медиборола
	при 275 нм (λ_1)	при 284 нм (λ_2)	при 288 нм (λ_3)		
0,1507	0,4661	0,5020	0,4423	19,97	$\bar{x} = 19,97$
0,1481	0,4882	0,5251	0,4667	20,07	$s^2 = 0,044261111$
0,1493	0,5244	0,5499	0,4861	20,01	$s = 0,210383248$
0,1500	0,5011	0,5321	0,4690	20,35	$s_{\bar{x}} = 0,070127749$
0,1509	0,4689	0,5014	0,4406	19,82	$P = 95\%$
0,1510	0,5113	0,5384	0,4740	20,14	$t(P, f) = 2,36$
0,1476	0,5470	0,5518	0,4756	19,68	$\Delta\bar{x} = 0,17$
0,1486	0,5273	0,5447	0,4723	19,98	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x} =$
0,1476	0,5259	0,5406	0,4686	19,72	$19,97 \pm 0,17$
					$\bar{\varepsilon} = 0,85\%$

Измерение оптической плотности осуществляли при трех длинах волн, соответствующих линейному участку спектра поглощения компонентов масла. Валидацию методики проводили по следующим параметрам: правильность, внутренняя (повторяемость) и промежуточная прецизионность. В качестве иллюстрации представлены результаты оценки метрологических характеристик методики определения содержания медиборола в растворе оливкового масла (табл. 2 и 3).

Повторяемость (внутренняя прецизионность) устанавливали на 2 %-х масляных растворах медиборола на основании 6 измерений (табл. 2). Относительная погрешность определения медиборола, в зависимости от характера используемого растительного масла в качестве растворителя, составляет от 2,08 до 2,35 %.

Промежуточную прецизионность определяли путем анализа 2 %-х масляных растворов медиборола при 6 повторяемости в разные дни (табл. 2). Полученные результаты показывают, что относительная погрешность определения медиборола в первый и второй день анализа находится в диапазоне от 2 до 3 %.

Таблица 2 – Определение внутренней и промежуточной прецизионности методики определения содержания медиборола в растворе оливкового масла

1-й день определения		2-й день определения	
Масса навески, г	Содержание медиборола в 1 мл масляного раствора, мг	Масса навески, г	Содержание медиборола в 1 мл масляного раствора, мг
0,3006	20,33	0,2993	20,26
0,2968	20,02	0,2984	19,43
0,2989	20,15	0,2936	20,25
0,2990	20,88	0,3065	19,18
0,2979	19,93	0,2946	19,59
0,3027	19,73	0,2928	19,60
Оценка погрешности определения медиборола			
$\bar{x} = 20,17$ $s^2 = 0,160746667$ $s = 0,400932247$ $s_{\bar{x}} = 0,163679904$ $P = 95\%$ $t(P,f) = 2,57$ $\Delta\bar{x} = 0,42$ $\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = 20,17 \pm 0,42$ $\bar{\varepsilon} = 2,08 \%$		$\bar{x} = 19,72$ $s^2 = 0,195896667$ $s = 0,442602154$ $s_{\bar{x}} = 0,180691573$ $P = 95\%$ $t(P,f) = 2,57$ $\Delta\bar{x} = 0,46$ $\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = 19,72 \pm 0,46$ $\bar{\varepsilon} = 2,33 \%$	

Таблица 3 – Оценка правильности методики определения содержания медиборола в растворе на оливковом масле методом «введено-найдено» ($P=0,95$, $n=3$)

Содержание медиборола в 1 мл масляного раствора		Относительное стандартное отклонение, %
Введено, мг *	Найдено, мг	
16,00	16,05	0,38
18,00	18,12	0,50
20,00	20,03	0,55
22,00	21,73	0,19
24,00	24,39	1,09

* Исходное содержание медиборола в оливковом масле 0 мг/мл.

Правильность методики определяли на 5 уровнях концентраций от теоретического значения содержания медиборола в масляном растворе, т.е. использовали для оценки данного параметра модельные масляные

растворы с содержанием медиборола (%): 1,6; 1,8; 2,0; 2,2; 2,4. Как видно из таблицы 3, разница между введенными и найденными значениями не существенна.

Таким образом, предложенная спектрофотометрическая методика позволяет определить содержание медиборола в масляных растворах в присутствии компонентов масел и удовлетворяет официальным рекомендациям по проведению валидации.

3.2. Методика количественного определения медиборола в масляном растворе методом ВЭЖХ

При разработке методики количественного определения медиборола в масляном растворе методом обращенно-фазной ВЭЖХ необходимо было подобрать оптимальные хроматографические условия для наиболее эффективного разделения веществ и полного выхода компонентов масла из колонки. При выборе состава подвижной фазы были исследованы смеси ряда растворителей (изопропиловый спирт, метиловый спирт, ацетонитрил) с водой в различных соотношениях, варьируя режимы элюирования. Наиболее приемлемое разделение веществ наблюдалось при использовании подвижной фазы: вода бидистиллированная (А, %) и изопропиловый спирт (Б, %), при следующем хроматографическом режиме:

Время, мин	А, %	Б, %	Режим
0 – 10	60→50	40→50	градиентный
10 – 20	25→10	75→90	градиентный
20 – 30	0	100	изократический

Чтобы избежать резкого повышения давления в хроматографе вследствие использования изопропилового спирта, была выбрана температура термостата колонки 40,0 °С, что приводило к снижению вязкости растворителя и отсутствию перепадов давления. Скорость потока подвижной фазы 100 мкл/мин, объем вводимой пробы 20 мкл. УФ-детектирование проводили при аналитической длине волны 282 нм, которая соответствует максимуму поглощения медиборола в подвижной фазе. Для пробоподготовки была выбрана смесь растворителей (изопропиловый спирт: вода бидистиллированная в соотношении 9:1), чтобы максимально приблизить к составу подвижной фазы.

Валидационную оценку разработанной методики осуществляли по следующим критериям: специфичность, правильность, внутренняя (повторяемость) и промежуточная прецизионность, пригодность хроматографической системы и робастность.

Времена удерживания медиборола, возможных примесей медиборола (*п*-крезола и 2-изоборнил-4-метилфенола), компонентов оливкового и персикового масел не совпадают, что свидетельствует о специфичности

методики. В качестве иллюстрации на рисунке 4 представлены хроматограммы медиборола и его 2 %-го раствора в персиковом масле. Определение остальных параметров валидации было проведено на растворе медиборола в персиковом масле.

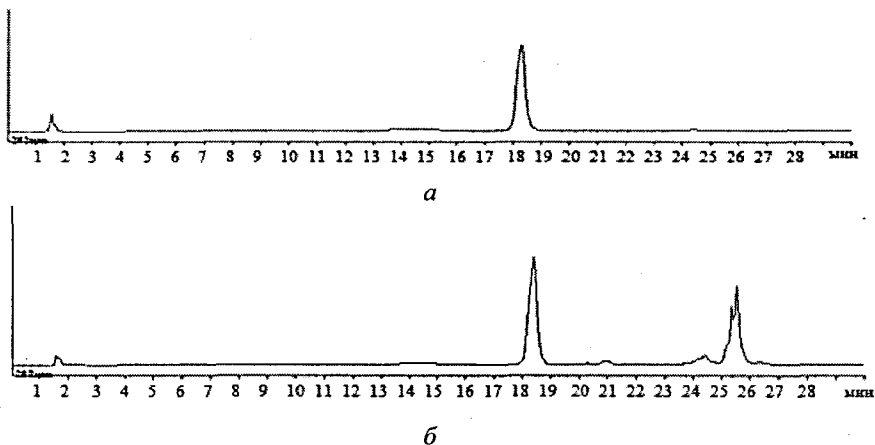


Рисунок 4 – Хроматограммы медиборола (а) и его 2 %-го раствора в персиковом масле (б)

Пригодность хроматографической системы характеризовали следующими параметрами: коэффициент асимметрии пика $0,80 \pm 0,03$, коэффициент емкости $10,15 \pm 0,01$, эффективность хроматографической колонки 20429 ± 1446 , величина относительного стандартного отклонения найденного значения содержания медиборола в 1 мл масляного раствора составил 0,89 %, критерий разделения лежал в диапазоне 4,10 – 4,88. Полученные результаты соответствуют рекомендациям US FDA (CDER) по валидации хроматографических методик в лабораториях.

Определение повторяемости проводили на шести параллельных пробах при концентрации 2,0 %-го раствора медиборола в масле. Как видно из таблицы 4, результаты статистически эквивалентны. Затем повторно проводили 6 параллельных измерений в другой день для выявления промежуточной прецизионности, чтобы охарактеризовать внутрिलाбораторную изменчивость. Полученные результаты показывают, что относительная погрешность определения медиборола в первый и второй день анализа находится в диапазоне от 0,81 до 0,94 % (табл. 4).

Правильность методики устанавливали на пяти уровнях концентраций модельных масляных растворов медиборола, %: 1,6; 1,8; 2,0; 2,2 и 2,4.

Как видно из таблицы 5, найденные и введенные значения близки между собой.

Таблица 4 – Выявление внутренней и промежуточной прецизионности методики определения содержания медиборола в масляном растворе

1-й день определения (03.11.2011)		2-й день определения (18.01.2012)	
Масса навески 2 %-го масляного раствора медиборола, г	Содержание медиборола в 1 мл масляного раствора, мг	Масса навески 2 %-го масляного раствора медиборола, г	Содержание медиборола в 1 мл масляного раствора, мг
0,0533	19,99	0,0502	20,17
0,0472	20,12	0,0499	20,25
0,0476	19,86	0,0478	19,89
0,0499	19,73	0,0481	19,78
0,0470	20,00	0,0512	20,01
0,0489	20,13	0,0497	20,13
Оценка погрешности определения медиборола			
$\bar{x} = 19,97$ $s^2 = 0,023817$ $s = 0,154326$ $s_{\bar{x}} = 0,063004$ $P = 95 \%$ $t(P, f) = 2,57$ $\Delta \bar{x} = 0,16$ $\bar{x} \pm \Delta \bar{x} = 19,97 \pm 0,16$ $\bar{e} = 0,81 \%$		$\bar{x} = 20,04$ $s^2 = 0,032016667$ $s = 0,178932017$ $s_{\bar{x}} = 0,07304869$ $P = 95 \%$ $t(P, f) = 2,57$ $\Delta \bar{x} = 0,19$ $\bar{x} \pm \Delta \bar{x} = 20,04 \pm 0,19$ $\bar{e} = 0,94 \%$	

Таблица 5 – Оценка правильности методики определения содержания медиборола в масляном растворе методом «введено-найдено» ($P=0,95, n=3$)

Содержание медиборола в 1 мл масляного раствора		Относительное стандартное отклонение, %
Введено, мг *	Найдено, мг	
16,00	15,93	1,31
18,00	18,11	0,61
20,00	20,02	0,70
22,00	22,14	1,23
24,00	23,98	1,03

* Исходное содержание медиборола в персиковом масле 0 мг/мл.

Для установления робастности проводили по 3 определения на 2,0 %-м масляном растворе при стандартных условиях (температура колонки 40 °С, скорость подачи 100 мкл/мин) и при изменении условий анализа (температура колонки 40 °С, скорость подачи 90 мкл/мин; температура колонки 35 °С, скорость подачи 100 мкл/мин). Влияние параметров оценивали с помощью следующих характеристик: время удерживания, разделение, фактор асимметрии, коэффициент емкости, число теоретических тарелок, площадь пика и полученное значение содержания основного вещества в масляном растворе. Снижение температуры и скорости потока незначительно влияло на параметры хроматографической системы, что указывает на надежность методики при ее использовании в указанных условиях.

Таким образом, разработанная методика позволяет определять содержание медиборола в масляном растворе с малой погрешностью. Другими достоинствами методики являются доступность, простота и возможность определения медиборола без предварительного отделения компонентов масла.

3.3. Методика количественного определения медиборола в ректальной форме

Для количественного определения медиборола в ректальной лекарственной форме предложен метод УФ-спектрофотометрии, который обладает рядом достоинств, таких как простота эксперимента, специфичность и др. При растворении суппозитория с медиборолом в изопропиловом спирте в области максимума поглощения анализируемого вещества поглощают и компоненты основы лекарственной формы, поэтому была выбрана пробоподготовка, основанная на экстракции медиборола из суппозитория 95 %-м этиловым спиртом при температуре 80–85 °С в течение 15 мин с последующим охлаждением на льду, чтобы максимально отделить компоненты основы свечей от раствора. Оптическую плотность полученного раствора измеряли на спектрофотометре при длине волны (282±2) нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Параллельно аналогичным образом измеряют оптическую плотность раствора РСО медиборола. В качестве раствора сравнения используют 95 %-й этиловый спирт.

Разработанная методика обладает специфичностью, так как позволяет определять анализируемое вещество в присутствии других компонентов лекарственной формы при аналитической длине волны (282±2) нм, которая соответствует максимуму поглощения этанольного раствора медиборола.

На рисунке 5 представлены спектры поглощения раствора медиборола и раствора основы суппозиторий. Анализ спектров поглощения показывал, что компоненты основы свечей не оказывают влияния на поглощение медиборола при заданной длине волны.

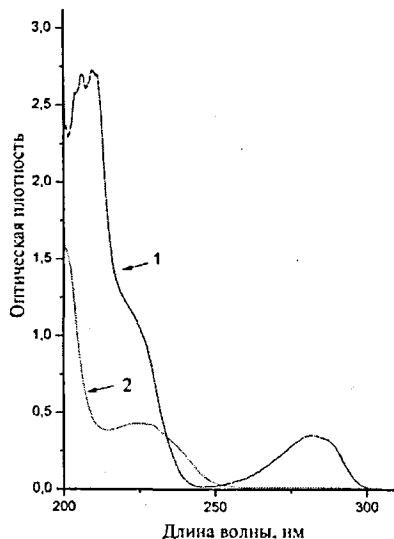


Рисунок 5 – Спектры поглощения этанольных растворов 0,005 %-го медиборола (1) и основы суппозиториев (2)

Таблица 6 – Результаты количественного определения медиборола в свечах

№	Оптическая плотность	Содержание медиборола в свечах, г	Оценка погрешности определения медиборола
1	0,3539	0,05006	$\bar{x} = 0,05001$ $s^2 = 1,88471 \cdot 10^{-7}$ $s = 0,000434133$ $s_{\bar{x}} = 0,000137285$ $P = 95 \%$ $t(P, f) = 2,26$ $\Delta \bar{x} = 0,00031$ $\bar{x} \pm \Delta \bar{x} = 0,05001 \pm 0,00031$ $\bar{\epsilon} = 0,62 \%$
2	0,3512	0,04967	
3	0,3581	0,05065	
4	0,3482	0,04925	
5	0,3565	0,05042	
6	0,3564	0,05041	
7	0,3506	0,04959	
8	0,3535	0,05000	
9	0,3553	0,05025	
10	0,3524	0,04984	

Прецизионность (повторяемость) методики оценивали на свечах с медиборолом с дозировкой 0,05 г при 10 определениях (табл. 6). Как следует из полученных данных, относительная погрешность определения

содержания медиборола составляет 0,62 %, что свидетельствует о высокой прецизионности методики в условиях повторяемости.

Параметр правильности для методики количественного определения медиборола в суппозиториях устанавливали с использованием модельных смесей на семи уровнях содержания действующего вещества в диапазоне 70–130 % от заявленного содержания в свече. Как видно из таблицы 7, различия между найденными и введенными значениями незначительны.

Таким образом, результаты проведенной валидации спектрофотометрической методики определения содержания медиборола в свечах показали, что данная методика является точной и позволяет определять содержание медиборола в свечах с малой погрешностью.

Таблица 7 – Оценка правильности методики определения содержания медиборола в свечах методом «введено-найдено» ($P=0,95$, $n=3$)

Содержание медиборола в свечах		Относительное стандартное отклонение, %
Введено, г *	Найдено, г	
0,03500	0,03507	0,83
0,04000	0,04082	0,69
0,04500	0,04514	0,78
0,05000	0,04991	0,42
0,05500	0,05529	0,96
0,06000	0,05986	0,99
0,06500	0,06401	1,08

* Исходное содержание медиборола в суппозитории 0 мг.

В рамках диссертационной работы проведены исследования, результаты которых представлены в Приложениях:

1. Разработка состава и технологии получения таблеток медиборола.

На основании анализа технологических свойств данной субстанции разработаны состав и технология изготовления таблеток медиборола. Оптимальным оказался следующий состав таблеток (масс. %): медиборола – 31,25, лактозы – 56,25, поливинилпирролидона – 3,00, примоджеля – 4,25, натрия кроскармеллозы – 4,40, магния стеарата – 0,85. Полученные таблетки соответствуют требованиям ГФ XI, ОСТ 64-072-89 «Таблетки. Типы и размеры» и ОФС 42-0003-04 «Растворение».

2. Разработка состава и технологии получения суппозиторий с медиборолом.

В качестве альтернативы пероральной лекарственной форме (таблеткам) разработаны суппозитории с медиборолом. Выбор рационального состава носителя для лекарственного вещества в суппозиториях осуществ-

влялся в опыте *in vitro* методом диализа через полупроницаемую мембрану. Наиболее полное высвобождение медиборола происходило из суппозиторий, приготовленных на основе жира кондитерского с добавлением эмульгатора Т-2. Таким образом, наиболее оптимальный состав суппозиторий (масс. %): медиборола – 3,85, жира кондитерского – 95,19, эмульгатора Т-2 – 0,96. Проведенная оценка качества суппозиторий по рассмотренным критериям показала, что суппозитории соответствуют требованиям, предъявляемым к данной лекарственной форме.

Выводы

1. Для определения медиборола в лекарственных формах (раствор в масле, суппозитории) методом ТСХ в качестве реактива для проявления пятен был подобран щелочной раствор калия гексацианоферрата (III), являющийся специфичным по отношению к лекарственному веществу.

2. В основе идентификации медиборола лежит окислительно-восстановительная реакция. С помощью физико-химических методов установлено, что конечным продуктом реакции является 3,5,3',5'-тетраизоборнилстильбен-4,4'-хинон ярко-оранжевого цвета. Определен предел обнаружения медиборола со щелочным раствором калия гексацианоферрата (III) на различных пластинках. Наименьший предел обнаружения (0,06 мкг) наблюдался при использовании пластинок «Сорб-фил».

3. Разработана спектрофотометрическая методика количественного определения медиборола в растворах оливкового и персикового масел с использованием методов Фирордта и наименьших квадратов. Результаты проведенной валидации показали, что данная методика способна давать воспроизводимые результаты в пределах аналитической области определения.

4. Предложена методика определения медиборола в масляном растворе методом ВЭЖХ с использованием колонки ProntoSIL-120-5-C-18 AQ DB-2003 (размер 2×75 мм, 5 мкм), подвижной фазы изопропиловый спирт: вода и УФ-детектора. Методика характеризуется высокой эффективностью, хорошей разрешающей способностью, специфичностью и позволяет устанавливать содержание медиборола без предварительного отделения компонентов масла. Относительная погрешность определения медиборола составляет менее 1,0 %.

5. Разработана методика количественного определения медиборола в суппозиториях методом УФ-спектрофотометрии. Установлены параметры: специфичность, повторяемость и правильность предложенной методики. Согласно проведенным испытаниям суппозитории с медиборолом 0,05 г удовлетворяют фармакопейным показателям качества для данной лекарственной формы.

6. На основании проведенных исследований составлены проекты фармакопейных статей предприятия на «Раствор медиборола в масле 2 % для инъекций» и «Свечи с медиборолом 0,05 г».

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Шелехова В.А. Разработка методики количественного определения медиборола в лекарственном препарате/ Е.А. Краснов, В.А. Шелехова // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – № 5. – С. 145–149.

2. Шелехова В.А. Спектрофотометрическое определение медиборола в масляных растворах / В.А. Шелехова, М.Б. Плотников, Е.А. Краснов// Журнал Сибирского федерального университета. Химия. – 2011. – Т. 4, № 2. – С. 183–190.

3. Шелехова В.А. Получение таблеток медиборола: разработка состава и технологии / Е.А. Краснов, Т.Г. Хоружая, В.А. Шелехова, Е.Е. Назмутдинова// Фармация. – 2011. – № 5. – С. 36–38.

4. Шелехова В.А. Разработка методик фармацевтического анализа таблетированной лекарственной формы медиборола / Е.А. Краснов, Е.Е. Назмутдинова, Т.Г. Хоружая, В.А. Шелехова // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2011. – № 11. – С. 28–31.

5. Шелехова В.А. Разработка технологии и оценка качества суппозиторий с медиборолом / В.А. Шелехова, Е.А. Краснов, Э.Ф. Степанова // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 7 (ч. 2). – С. 445–448.

6. Шелехова В.А. Разработка и валидация методики количественного определения медиборола в масляном растворе / В.А. Шелехова, Е.А. Краснов, А.В. Пустовойтов, Н.М. Мордвинова, О.В. Старкова // Журнал Сибирского федерального университета. Химия. – 2012. – Т. 5, № 3. – С. 332–341.

7. Шелехова В.А. Разработка параметров стандартизации суппозиторий с медиборолом / В.А. Шелехова, Е.А. Краснов, Э.Ф. Степанова // Журнал Сибирского федерального университета. Химия. – 2014. – Т. 7, № 1. – С. 71–78.

8. Шелехова В.А. Анализ растворов в масле и суппозиторий, содержащих медиборол / В.А. Шелехова, Е.А. Краснов // Разработка, исследование и маркетинг нового фармацевтической продукции: сборник научных трудов. – Пятигорск: Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, 2013. – Вып. 68. – С. 292–293.

9. Шелехова В.А. Определение содержания медиборола в масляном растворе методом ВЭЖХ / В.А. Шелехова, Е.А. Краснов, А.В. Пустовойтов, Н.М. Мордвинова // Тез. докл. на Шестой всерос. конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием. «Мен-

делеев-2012». Секция: Аналитическая химия. – СПб, 2012. – С. 120–122.

10. Шелехова В.А. Анализ лекарственных средств медиборола методом ВЭЖХ / Е.А. Краснов, В.А. Шелехова, Е.Е. Назмутдинова, А.В. Пустовойтов, Н.М. Мордвинова // 2-я Всерос. конференция «Аналитич. хроматография и капиллярный электрофорез». – Краснодар, 2013. – С. 114.

Печ. л. 1.

Тираж 100 экз. Заказ № 48.

Тираж отпечатан в типографии ИОА СО РАН.

634055, г. Томск, пл. Академика Зueva, 1.

Тел. 49-10-93.