

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

_____ Р.А. Часнойть

30 мая 2007 г

Регистрационный № 050-0606

**ИСПЫТАНИЕ НА ПОДЛИННОСТЬ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ,
ОБЛАДАЮЩИХ АНТИАРИТМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ,
МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Витебский государственный
медицинский университет»

АВТОРЫ: д-р фарм. наук, проф. А.И. Жебентяев, В.М. Ершик

Витебск 2006

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Средства измерений:

Весы аналитические ВЛА-200 или аналогичные (ГОСТ 34104-80Е).

Набор гирь 2 класса точности (ГОСТ 7328-82).

Колбы мерные вместимостью 10, 25, 50 см³ (ГОСТ 1770-74).

Капилляры стеклянные градуированные на 2,0 мкл.

Камера хроматографическая стеклянная.

Могут быть использованы и другие средства измерений и вспомогательные устройства, не уступающие по точности рекомендуемым в методике.

Реактивы:

Метопролола тартрат (Eur. Ph. 4.6; 01/2003:1028).

Этацизина гидрохлорид (ФС 98-0141-Р1-42-17-98).

Верапамила гидрохлорид (Eur. Ph. 4.6; 01/2002:0573).

Амиодарона гидрохлорид (Eur. Ph. 4.6; 01/2003:0803).

Спирт этиловый, 95%-ый (ГФ, выпуск X, статья 631).

Ацетон, чда (ГОСТ 2603-79).

Вода очищенная (ФС 42-2619-89).

Йод кристаллический (ГФ, выпуск X, статья 354).

Пластинки для тонкослойной хроматографии (сорбент — силикагель КСКГ) с диаметром пор 11–13 нм, размером фракций 5–17 мкм, толщиной слоя 110-130 мкм (ТУ26-11-17-89).

УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

- температура воздуха (20 ± 2 °С);
- влажность воздуха не более 80% при температуре 25 °С;

– атмосферное давление (95 ± 10 кПа).

Анализ выполняется химиком-аналитиком.

НОРМЫ ПОГРЕШНОСТЕЙ ИЗМЕРЕНИЙ

Предел обнаружения в пробе лекарственных веществ (верапамила, метопролола, амиодарона и этацизина), обладающих антиаритмической активностью, составляет 0,5 мкг.

3. МЕТОД ИЗМЕРЕНИЙ

Метод измерения — тонкослойная хроматография (ТСХ). Выделение фармакологически активных веществ из лекарственных средств производится методом экстракции этанолом. Этот вариант пробоподготовки обеспечивает высокую степень извлечения определяемых веществ и низкую загрязненность пробы сопутствующими веществами (вспомогательные вещества таблеток). Метанол или хлороформ в качестве извлекателей не имеют преимуществ перед этанолом. Метанол входит в список веществ, обладающих высокой токсичностью (список А). Хлороформ летуч и токсичен.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Нанесение проб на хроматографическую пластинку

Используют готовые хроматографические пластинки с закрепленным на алюминиевой подложке слоем силикагеля (связующее вещество — силиказоль), содержащие индикатор, флуоресцирующий при 254 нм. Для исключения краевого эффекта с боковых кромок пластинки снимают полосы сорбента толщиной 1,5–2 мм. Высота пластинки — 10 см.

При проведении хроматографирования пробы наносят на стартовую линию, находящуюся на расстоянии 10 мм от нижнего края пластинки. Расстояние от боковой кромки должно быть не менее 8–10 мм, а между центрами пятен — 5–6 мм. При испытании на подлинность

лекарственного средства пластинку делят на две зоны А и Б: в первую наносят раствор исследуемого вещества, во вторую — раствор стандартного вещества.

После нанесения веществ необходимо полностью удалить растворитель с поверхности пластинки.

2. Приготовление реактивов

2.1. Приготовление стандартных растворов (1,0 мг/мл)

Навеску веществ (атенолола, метопролола, этацизина, верапамила, амиодарона) фармакопейной чистоты в 0,0250 г переносят в мерную колбу на 25 см³, добавляют 15–20 мл этанола, перемешивают до растворения. Объем раствора доводят до метки этанолом. Срок хранения растворов 6 мес. при температуре 0–4 °С в защищенном от света месте.

2.2. Приготовление подвижной фазы для ТСХ и подготовка хроматографической камеры

В хроматографическую камеру помещают 8 мл ацетона, 2 мл воды очищенной и перемешивают. Камеру герметично закрывают крышкой и оставляют на 30 мин при комнатной температуре. Это время необходимо для насыщения хроматографической камеры парами подвижной фазы с целью получения воспроизводимых результатов.

2.3. Насыщение камеры парами йода

В герметично закрывающуюся камеру помещают 1–2 г измельченного кристаллического йода и выдерживают 30 мин.

3. Выделение лекарственных веществ из лекарственных средств (таблетки амиодарона, 200 мг; верапамила, 80 мг; метопролола тартрата, 50, 100, 200 мг; этацизина, 50 мг)

Навеску таблеточной массы, эквивалентную 50 мг лекарственного вещества, помещают в мерную колбу объемом 50 мл, добавляют

примерно 25 мл этанола, перемешивают и встряхивают в течение 10 мин. Содержимое колбы доводят этанолом до метки и перемешивают.

В зону А хроматографической пластинки наносят 2 мкл полученного раствора, в зону Б — 2 мкл стандартного раствора. После хроматографирования пластинку сушат и проявляют в камере, насыщенной парами йода в течение 10 мин, либо в УФ-свете с длиной волны 254 нм.

Рассчитывают значения R_f проявившихся пятен и сравнивают с R_f стандартных веществ (метопролол — 0,17–0,21; этализин — 0,47–0,51; верапамил — 0,62–0,66; амиодарон — 0,69–0,73).

При проявлении парами йода пятна с течением времени исчезают, поэтому контуры пятен обводят карандашом.

ОБОСНОВАНИЕ ПРЕИМУЩЕСТВ ПРЕДЛАГАЕМОГО МЕТОДА

Тонкослойная хроматография широко используется в фармацевтическом анализе для разделения и идентификации веществ различной химической природы. Основные преимущества данного варианта:

- невысокая стоимость используемого оборудования и материалов;
- экспрессность;
- возможность идентификации нескольких проб одновременно;
- возможность идентификации лекарственных веществ, обладающих антиаритмическим действием в присутствии продуктов их деструкции.

В настоящее время отсутствуют универсальные системы ТСХ для обнаружения указанных лекарственных средств. Согласно нормативной документации (РБ 3079-2003, РБ 4466-2003) обнаружение метопролола и амиодарона осуществляется методом ВЭЖХ и спектрофотометрии в УФ-области. Обнаружение верапамила (ФС 42У-4-617-99) осуществляется методом ТСХ на пластинках «Silicagel 60» или «Silufol» производства

«Merck». Таблеточную массу встряхивают с метиленом хлористым, фильтруют, упаривают досуха, растворяют в хлороформе и наносят на пластинки. Проводят параллельно двукратное хроматографирование в системе ацетон — кислота уксусная ледяная — метанол — толуол (5:5:20:70) и двукратное хроматографирование в системе диэтиламин — циклогексан (15:85). Идентификацию этацизина осуществляют спектрофотометрией в УФ-области и качественными реакциями по изменению окраски при нагревании с HCl и по появлению синей окраски под действием бромной воды (ФС 42-2834-92).

Идентификация лекарственных веществ методом ВЭЖХ требует дорогостоящего оборудования, из-за чего затруднительно применять этот метод для массовых исследований. Спектры веществ в ультрафиолетовой области малоинформативны. Качественная реакция этацизина с хлороводородной кислотой при нагревании, и реакция с бромной водой не является специфичной. Эту реакцию дают все ацилпроизводные фенотиазина. Методика идентификации верапамила требует проведения сложной пробоподготовки, использования дорогостоящих хроматографических пластинок и двукратного хроматографирования.

Разработка высокочувствительных и селективных методик оценки качества лекарственных средств является актуальной задачей в связи с требованиями улучшения качества жизни и снижения количества фальсифицированной продукции на фармацевтическом рынке. В связи с этим необходимы простые, доступные и точные методики для анализа лекарственных средств.

Предлагаемая новая подвижная фаза позволяет проводить испытание на подлинность антиаритмических лекарственных средств (метопролол, этацин, верапамил, амиодарон) методом ТСХ в одной хроматографической системе при однократном хроматографировании.

Разработанная методика обладает хорошей воспроизводимостью результатов анализа, проста в исполнении, не требует использования дорогостоящего оборудования. При проведении испытаний на подлинность используются широко распространенные и недорогие пластинки «Сорбфил» Российского производства.