

Возможности флуоресцентного (спектрального) экспресс-анализа твердых лекарственных форм

Ю.Г. Зюзькова¹, В.Е. Прокопьев², В.В. Удут¹, Л.Г. Воробьева³,
Н.Н. Каркищенко⁴

¹ – ФГБУ «НИИ Фармакологии» СО РАМН

² – Институт сильноточной электроники СО РАН

³ – Институт оптики атмосферы СО РАН, Томск

⁴ – ФГБУ «Научный центр биомедицинских технологий» РАМН, Московская область

Контактная информация: Ю.Г. Зюзькова, e-mail: zzkvyulya@rambler.ru

В работе исследованы и измерены спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции таблетированных дротаверина гидрохлорида, папаверина гидрохлорида и их стандартов. Показано, что длинноволновый сдвиг в спектральных характеристиках дротаверина, по сравнению с папаверином, объясняется большим числом смежных сопряженных связей в его молекуле. Корреляционный и многомерный статистический анализ (метод главных компонент) спектров таблетированных форм изучаемых лекарственных средств позволяет их идентифицировать с точностью не менее чем 99,99%. Подтверждена возможность количественного определения лекарственных средств в присутствии сопутствующих вспомогательных веществ.

Ключевые слова: дротаверина гидрохлорид, папаверина гидрохлорид, спектры (возбуждения) флуоресценции, контроль качества, метод главных компонент.

Контроль качества лекарственных средств (ЛС) решает три основные задачи: испытание на подлинность, чистоту и количественное определение фармакологически активного компонента. Анализ осуществляется на всех этапах производства – от контроля сырья до оценки качества ЛС с оценкой его стабильности, сроков годности и стандартизации готовой лекарственной формы.

Методы оценки качества ЛС можно разделить на электрохимические, оптические и хроматографические: высокоэффективная жидкостная, газовая и твердотельная хроматографии, масс-спектрометрия, ЯМР, ИК-, УФ-спектроскопия, полярография и др. Их сочетание позволяет успешно решать задачи разделения сложных смесей, определять их качественный и количественный состав, а также природу отдельных компонентов. К сожалению, большинство этих методов требует сложной и длительной пробоподготов-

ки. Фотометрические методы в ИК-, УФ-, видимой области спектра и их модификации, включенные в национальные фармакопеи многих стран, просты для фармацевтического анализа, но не лишены принципиальных недостатков (относительно небольшой чувствительности и сложности оценки коэффициентов и спектров поглощения неоднородных, дисперсных и сильнопоглощающих веществ), исключающих возможность проведения экспресс-анализа твердых лекарственных форм. В этом контексте преимущества анализа спектров флуоресценции и комбинационного рассеяния органических молекул неоспоримы с учетом того, что возбуждение флуоресценции определяемых веществ возможно при облучении образцов не только оптическим излучением, но и электронными и рентгеновскими пучками [1, 2].

Целью исследования явился качественно-количественный анализ действующего начала

в таблетированных (Т) формах ЛС с помощью различных оптико-спектроскопических методов.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования выбраны схожие по химической структуре, но различающиеся количеством и порядком сопряженных связей, числом оптических изомеров и длиной углеводородных радикалов спазмолитики бензилизохинолинового ряда – папаверина гидрохлорид (ПГ) и его полусинтетический аналог – дротаверина гидрохлорид (ДГ).

Исследованы таблетки различных производителей для ДГ: но-шпа, дротаверина гидрохлорид, дротаверин форте; и ПГ: папаверина гидрохлорид и папазол. А также субстанция (РСО) ДГ серии КУ-ДН-20090302 от 03.2009 г. производства «Чжецзян Апелоа Фармацевтикал Ко., Лтд», Китай, соответствует требованиям НД 42-12678-02 и ПГ серии 671107 от 04.2008 г. производства ОАО «Ирбитский ХФЗ», соответствует требованиям ФСП 42-0173-2324-02.

Препараты исследовались на воздухе при комнатной температуре в виде таблеток (Т-ДГ, Т-ПГ), моделей таблеток (МТ) и РСО. Модельные смеси включали вспомогательные вещества (сахароза, крахмал картофельный, кальция и магния стеарат, тальк, поливинилпирролидон, лактозы моногидрат, повидон), присутствующие в Т-ЛС. На основании метода стандартных эталонных проб по спектрам флуоресценции изучаемых объектов оценивалось количество действующих веществ.

Спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции снимали в диапазоне 200÷900 нм с разрешением 1 нм – на спектрофлуориметре «Hitachi 850».

В работе использована программа анализа спектральных характеристик, полученных

на приборах, созданных на базе фотодиодных линеек LX511 или датчиках аналогичного типа. Входными данными являлись файлы спектров, имеющие 2048 строки, содержащие частоту и интенсивность излучения соответствующих спектральных точек. Для анализа полученных спектров использован метод главных компонент [5, 6].

Результаты и их обсуждение

Спектры флуоресценции (СФ) и возбуждения флуоресценции (ВФ) ПГ изучали вблизи характерных длин волн поглощения и возбуждения флуоресценции в УФ-области. Для РСО регистрировали спектры на четырех длинах волн возбуждения ($\lambda_{\text{в}}$) 250, 280, 300, 350 нм. Было обнаружено, что максимальная интенсивность (I_{max}) СФ практически не зависела от длины волны СВФ (рис. 1б). Так, при переходе от $\lambda_{\text{в}250}$ к $\lambda_{\text{в}350}$ выявлено незначительное смещение максимумов полос спектров флуоресценции в длинноволновую область и увеличение их интенсивности: при $\lambda_{\text{в}250}$ максимум приходится на I_{448} ; при $\lambda_{\text{в}280}$ – I_{449} ; при $\lambda_{\text{в}300}$ – I_{450} ; при $\lambda_{\text{в}350}$ – I_{452} . Нормировка СФ РСО показала их совпадение в пределах точности измерений (рис. 1а). Исходя из I_{max} измеряемого сигнала флуоресценции, для определения подлинности РСО оптимальна $\lambda_{\text{в}350}$ нм.

На рис. 2 (а, б) приведены СФ Т-ПГ, МТ, плацебо и вспомогательных веществ, входящих в состав ЛС, при $\lambda_{\text{в}280}$ и $\lambda_{\text{в}350}$. Характерно, что интенсивность флуоресценции сахарозы и кальция стеарата минорна и не мешает определению действующего начала. Максимумы полос СФ плацебо при $\lambda_{\text{в}280}$ приходятся на I_{411} и на I_{426} при $\lambda_{\text{в}350}$, что близко к I_{max} излучения крахмала. При облучении образцов на $\lambda_{\text{в}280}$ спектры и интенсивности флуоресценции крахмала и плацебо близки к совпадению.

Снижение интенсивности СФ крахмала и плацебо при переходе с $\lambda_{\text{в}280}$ на $\lambda_{\text{в}350}$ объясня-

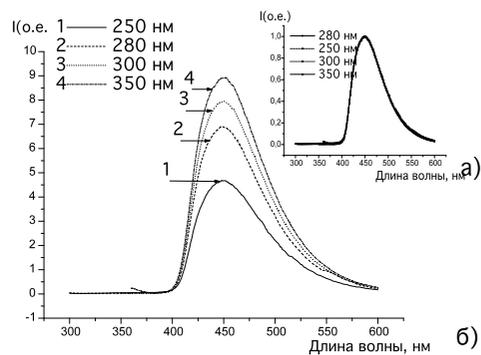


Рис. 1. Спектры РСО ПГ при $\lambda_{в}$ 250, 280, 300, 350 нм: (а) – нормированные СФ; (б) – СФ.

ется незначительным поглощением крахмала и других вспомогательных веществ вблизи 350 нм. Это демонстрирует максимальный вклад крахмала в СФ при $\lambda_{в280}$ и его снижение с ростом длины волны возбуждения. I_{max} флу-

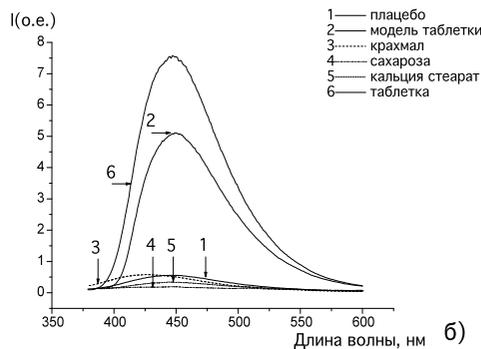
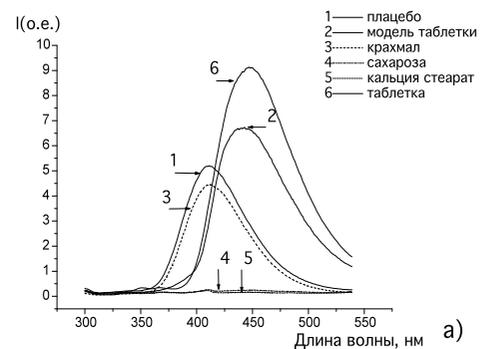


Рис. 2. СФ ПГ: 1 – плацебо; 2 – МТ; 3-5 – вспомогательных веществ (3 – крахмала, 4 – сахарозы, 5 – кальция стеарата); 6 – Т-ДГ, при $\lambda_{в}$ (а) 280, (б) 350 нм.

оресценции Т-ПГ при $\lambda_{в280}$ и $\lambda_{в350}$ приходится на 446 ± 1 нм. Для МТ I_{max} СФ близки к указанному выше (I_{443} при $\lambda_{в280}$ и I_{447} при $\lambda_{в350}$). Смещение первого I_{max} в коротковолновую область объясняется тем, что при ВФ на $\lambda_{в280}$ вклад в интенсивность флуоресценции вносит крахмал. Подтверждением этого являются результаты нормирования СФ изучаемых образцов (рис. 3): I_{max} РСО приходится на $\lambda_{в448}$; I_{max} в серии Т-ПГ не различается и в пределах 1 нм совпадает с таковой РСО; в МТ ПГ I_{max} сдвинута в коротковолновую сторону и составляет 443 нм. Это смещение свидетельствует об отсутствии влияния технологического процесса производства таблеток на физико-химические свойства модели (порошок), где соблюдены алиquotы используемых веществ, но исключены этапы растворения, грануляции и прессования.

На рис. 4 представлены нормированные СФ изучаемых образцов при $\lambda_{в350}$. Различия интенсивности СФ в области 390÷420 нм для Т-ЛС различных производителей в сравнении со СФ РСО объясняются вкладом флуоресценции входящего во вспомогательные вещества крахмала, который и повышает интенсивность в коротковолновой области спектра.

На рис. 5 представлены спектры ВФ исследуемых веществ, регистрируемые на λ_{450} нм. Видно, что спектры ВФ крахмала и плацебо идентичны, но отличаются от аналогичных спектров РСО и Т-ПГ. Длины волн возбуждения последних продолжают вплоть до λ_{420} нм, в то время как ВФ крахмала и плацебо регистрируется до λ_{350} нм с основным вкладом во флуоресценцию плацебо крахмала. Этот факт еще раз подтверждает необходимость использования $\lambda_{в350-400}$ нм для определения ПГ.

На рис. 6, где приведены спектры ВФ РСО и Т-ПГ при длине волны флуоресценции ($\lambda_{ф}$) 450 нм, видно, что спектр ВФ последней более сложен, и единственное объяснение этому – наличие вспомогательных веществ,

в частности, крахмала, который обеспечивает прирост интенсивности в области 280÷320 нм. Однако, несмотря на разницу в спектрах ВФ РСО и Т-ПГ, максимумы полос флуоресценции приходятся на 448 нм в широком диапазоне длин волн возбуждения (350÷400 нм). При возбуждении этих образцов на $\lambda_{в380}$. СФ по данным корреляционного анализа совпадают с точностью не ниже $g \geq 99,99$.

Для РСО ДГ регистрация СФ проводилась на шести характерных $\lambda_{в}$ – 300, 350, 380, 400, 420, 450 нм. В отличие от РСО ПГ, для РСО ДГ положение полосы флуоресценции, его I_{max} и интенсивность зависела от $\lambda_{в}$ (рис. 7). При переходе от $\lambda_{в300}$ к $\lambda_{в450}$ наблюдается его

смещение в длинноволновую область и незначительное уменьшение интенсивности флуоресценции: при $\lambda_{в}=300, 350$ и 380 нм максимум приходится на I_{486} ; при $\lambda_{в400}$ – на I_{506} ; $\lambda_{в420}$ – I_{522} ; $\lambda_{в450}$ – I_{526} . При нормировании этих спектров видно, что положение полос флуоресценции и их максимумы $\lambda_{ф}$ (486÷526 нм) значительно изменяются и смещаются в длинноволновую сторону. Эти изменения указывают на неэлементарный характер происхождения спектров и свидетельствуют о молекулярной неоднородности субстанции, доказывая присутствие в РСО ДГ, по крайней мере, четырех оптических изомеров или ассоциатов молекул ДГ [3].

При сравнении и анализе СФ МТ ДГ, плацебо и вспомогательных веществ

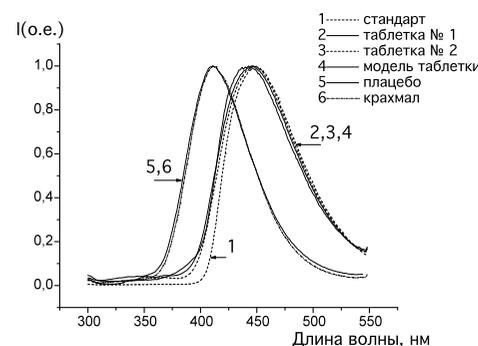


Рис. 3. Нормированные СФ: 1 – РСО; 2, 3 – Т-ПГ №№1, 2; 4 – МТ; 5 – плацебо; 6 – крахмала, при $\lambda_{в}$ 280 нм.

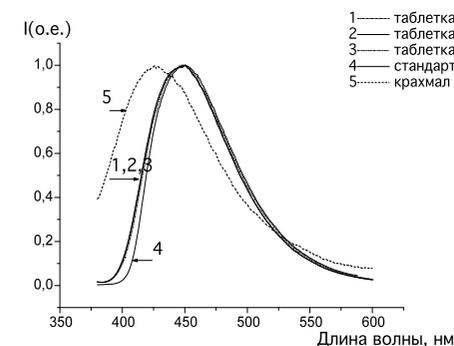


Рис. 4. Нормированные СФ: 1, 2, 3 – Т-ПГ №№1, 2, 3; 4 – РСО; 5 – крахмала, при $\lambda_{в}$ 350 нм.

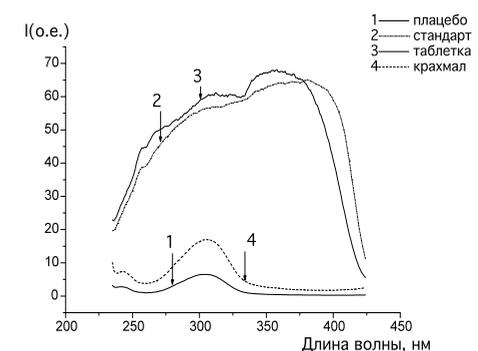


Рис. 5. Спектры ВФ: 1 – плацебо, 2 – РСО, 3 – Т-ПГ, 4 – крахмала, при $\lambda_{ф}$ 450 нм.

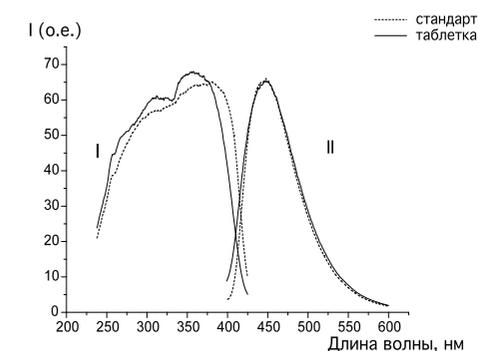


Рис. 6. Спектры РСО и Т-ПГ: I – ВФ ($\lambda_{ф}$ 450 нм), II – СФ ($\lambda_{в}$ 380 нм).

при $\lambda_{в280}$ и $\lambda_{в350}$ (рис. 8) выявлено, что I_{max} полосы флуоресценции плацебо приходится на I_{413} при $\lambda_{в280}$ и на I_{428} при $\lambda_{в350}$, вблизи I_{max} крахмала. А снижение интенсивности флуоресценции вещества при переходе с $\lambda_{в280}$ на $\lambda_{в350}$ объясняется уменьшением вклада крахмала (рис. 5). Смещение полосы флуоресценции в длинноволновую область спектра и увеличение интенсивности флуоресценции МТ ДГ также объясняется вкладом крахмала при $\lambda_{в280}$, что подтверждается длинноволновым сдвигом при $\lambda_{в350}$, когда усиливается вклад молекулы ДГ в интенсивность флуоресценции. Несмотря на относительно высокую интенсивность флуоресценции в области 400÷450 нм лактозы, магния стеарата, повидона и талька, при $\lambda_{в280}$ и $\lambda_{в350}$ их влияние можно не учитывать, поскольку полоса флуоресценции ДГ и её максимум находятся в области 500 нм.

Нормирование СФ изучаемых образцов при $\lambda_{в350}$ демонстрирует, что в СФ МТ наблюдается полоса, совпадающая с РСО – I_{486} , но отличающаяся от таковой Т-ДГ – I_{522} . Разведение МТ ДГ водой приводит к схождению их максимумов (для МТ ДГ – I_{524}). В этом случае в области 400÷500 нм форма и вид полосы отличается подъемом коротковолнового плеча, что указывает на присутствие коротковолновых изомерных форм ДГ [4].

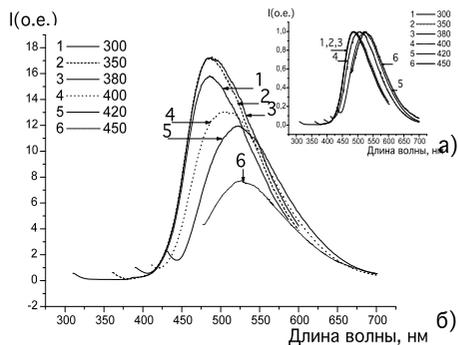


Рис. 7. Спектры РСО ДГ при $\lambda_{в}=300, 350, 380, 400, 420, 450$ нм: (а) – СФ; (б) – нормированные СФ.

По данным нормированных СФ и ВФ образцов (рис. 9, 10) следует, что определение подлинности готовых форм ДГ возможно при $\lambda_{в420}$ нм. При этом I_{max} СФ должен приходиться на $\lambda_{в}=525\pm 1$ нм.

Методом главных компонент [7] определены матрицы счетов 8 образцов Т-ДГ и 7 Т-ПГ различных производителей и сроков хранения, их РСО и МТ. Данные в области 370÷700 нм с шагом 1 нм получены при $\lambda_{в350}$. Спектры нормированы на максимальное значение и затем центрированы (рис. 11). Максимум ПГ находится на ~450 нм (полуширина $\Delta\lambda\sim 40$), а максимум ДГ – на 525 ± 5 нм (полуширина $\Delta\lambda\sim 80$). Спектральные кривые перекрываются, и максимум ПГ приходится на коротковолновое крыло флуоресценции ДГ. Отношение ненормированных эксперимен-

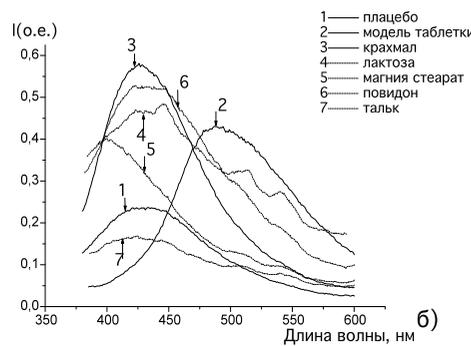
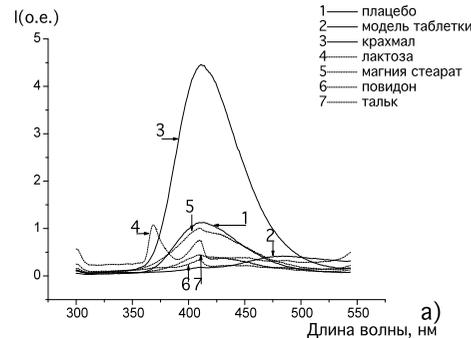


Рис. 8. СФ ДГ: 1 – плацебо; 2 – МТ; 3-7 – вспомогательных веществ (3 – крахмала; 4 – лактозы; 5 – магния стеарата; 6 – повидона, 7 – талька), при $\lambda_{в}$ (а) 280, (б) 350 нм.

тальных спектров $I_{ДГ}/I_{ПГ}$ для 40-й длины волны ($I_{max} ПГ-\lambda_{450}$ нм) $\approx 0,18$. Длинноволновый сдвиг флуоресценции ДГ объясняется большим количеством смежных сопряженных связей [3]. СФ Т-ДГ, РСО и МТ ДГ, сохраняя форму и полуширину полосы флуоресценции, различаются на 5÷10 нм в зависимости от производителей, сроков и условий хранения. При $\lambda_{в420}$ СФ всех образцов, содержащих ДГ, совпадают.

Как видно из графика счетов (рис. 12), анализируемые ЛС образуют 2 кластера. Координаты ПГ и его РСО, в отличие от ДГ, имеют незначительный разброс. Для ДГ только возбуждение СФ РСО и МТ ДГ на $\lambda_{в420}$ обеспечивает совпадение их координат с Т-ЛС.

С учетом того, что в таблетированных формах и порошковых смесях определение значения оптической плотности в полосе поглощения действующего вещества невозможно вследствие больших абсолютных значений поглощения и рассеяния излучения, а также её зависимости от размеров и формы частиц, количество действующего вещества определяли по интенсивности излучения в максимуме полосы его флуоресценции. На рис. 13 показаны калибровочные кривые зависимости интенсивности флуоресценции от количества РСО в образцах. Линейность интенсивности флуоресценции на выбран-

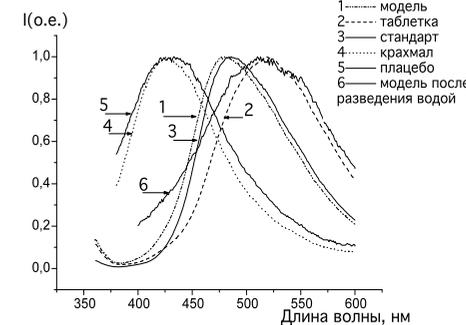


Рис. 9. Нормированные СФ: 1 – МТ ДГ до разведения водой; 2 – Т-ДГ; 3 – РСО; 4 – крахмала; 5 – плацебо; 6 – МТ после разведения, при $\lambda_{в}$ 350 нм.

ных длинах волн возбуждения и регистрации демонстрирует возможность количественного определения действующего вещества, по крайней мере, в исследованном диапазоне концентрации.

Выводы

Таким образом, определение действующего начала в Т-ЛС без их разрушения с использованием флуоресцентных технологий является весьма перспективным методом в силу его точности и экспрессности. При качественном и количественном определении ПГ для ВФ необходимо использовать $\lambda_{в}=350\pm 10$ нм, а максимум флуоресценции должен приходиться на $\lambda_{ф}=450\pm 1$ нм, а для ДГ, соответственно, $\lambda_{в}=420\pm 10$ нм и $\lambda_{ф}=525\pm 1$ нм.

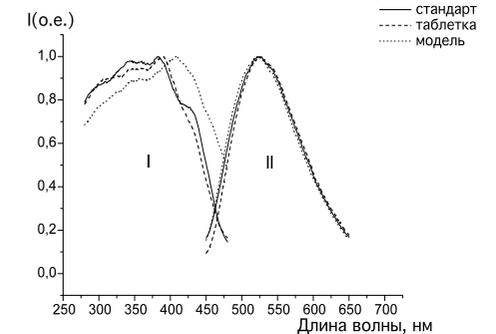


Рис. 10. Нормированные спектры: I – ВФ ($\lambda_{ф}$ 510 нм), II – СФ ($\lambda_{в}$ 420 нм): 1 – РСО, 2 – Т-ДГ, 3 – МТ.

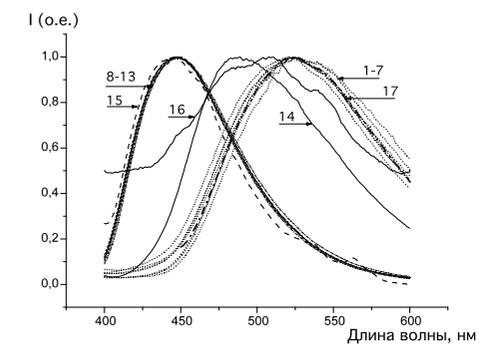


Рис. 11. Нормированные СФ: 1-7 – Т-ДГ, 8-10 – Т-ПГ, 11-13 – папазола; 14 – МТ ДГ с водой; РСО: 15 – ДГ, 16 – ПГ, при $\lambda_{в}$ 350 нм; 17 – ДГ, при $\lambda_{в}$ 420 нм.

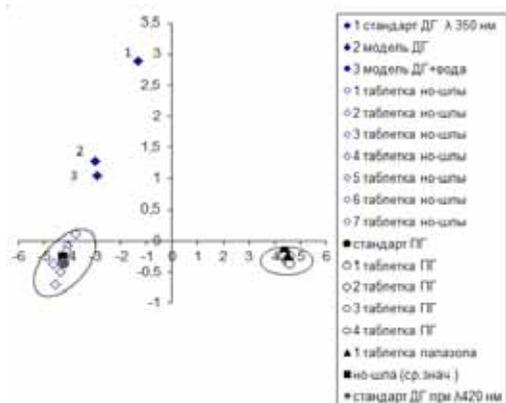
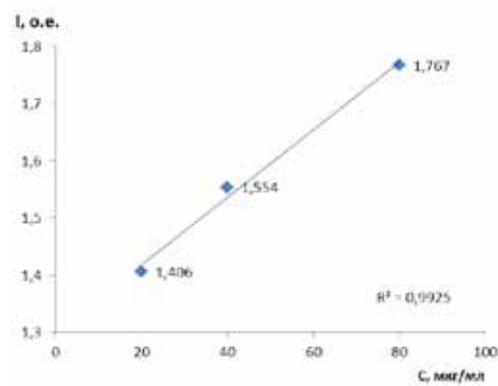


Рис. 12. Матрица счетов Т-ДГ и Т-ПГ, РСО, МТ ПГ и ДГ.

Рис. 13. Калибровочная кривая МТ ПГ $\lambda_{\text{в}}$ 280 нм.

Список литературы

1. Удут В.В., Прокопьев В.Е., Зюзькова Ю.Г., Стыкон Г.А. Оригинальный прибор экспресс-контроля качества готовых лекарственных средств // XVIII Международной конференции и дискуссионного научного клуба 10 «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии». Украина. Крым. том 1. 2010. С. 56.

2. Прокопьев В.Е., Удут В.В. Установка экспресс-контроля качества готовых лекарственных средств // Медицинская техника. №6 (258). 2009. С. 27-33.

3. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. Пер. с англ. –

М.: Мир. 1986. 496 с.

4. Чушов В.И., Чернов М.Ю., Хохлова Л.М. Промышленная технология лекарств. Х.: МТК-Книга; Изд-во НФАУ. 2002. Том 2. С. 353.

5. Blanco M., Villarroya I. NIR spectroscopy a rapid-response analytical tool // Trends Anal. Chem. №21. 2002. 240 p.

6. Wold S., Esbensen K., Geladi P. Principal component analysis // Chemom. Intell. Lab. Syst. 1987. V.2. 37 p.

7. Naes T., Igrens C., Martens H. Comparison of linear statistical methods for calibration of NIR instruments. Appl. Stat. 1986. P. 35, 195.

Possibilities of the fluorescent (spectral) express analysis of firm medicinal forms

Yu.G. Zyuzkova, V.E. Prokopyev, V.V. Udut, L.G. Vorobyeva, N.N. Karkischenko

Fluorescence spectra, fluorescence excitation spectra of tableted form of papaverine hydrochloride and drotaverine hydrochloride and spectra the drugs standards were measured and studied. It was shown that spectral characteristics of drotaverine have a long-wave shift in comparison with spectral characteristics of papaverine that could be explained by the fact that drotaverine molecule has more adjacent conjugated bonds than papaverine molecule. Correlative and multivariate statistical analysis (method of principal components) of studied drugs tableted forms spectra allows to identify the drugs with an accuracy not less than 99,99. The present research confirmed the possibility of drugs quality analysis in the presence of adjuvants.

Key words: drotaverine hydrochloride, papaverine hydrochloride, fluorescence (excitation) spectra, quality control, principal components method.



НОВЫЕ РЕГУЛЯТОРНЫЕ ПЕПТИДЫ

Влияние препаратов пептидного происхождения и их комбинаций на устойчивость крыс к острой гипобарической гипоксии

Х.Х. Семенов, Н.Н. Каркищенко, В.Н. Каркищенко, Г.Д. Капанадзе, О.И. Степанова, Л.Х. Казакова, А.О. Ревякин, Н.В. Касинская, Е.Л. Матвеевко, С.Е. Деньгина, Ю.В. Фокин

ФГБУ «Научный центр биомедицинских технологий» РАМН, Московская область

Контактная информация: академик РАН, член-корр. РАН Каркищенко Николай Николаевич, niknik2808@yandex.ru

Работа посвящена поиску фармпрепаратов, способных повысить резистентность организма к гипоксии. На крысах линии Wistar проводили испытания препаратов пептидного происхождения и их комбинаций на гипоксическую активность. Экспериментально установлено: все исследуемые препараты и их комбинации были высоко активны, что проявилось в повышении резистентности организма подопытных крыс к острой гипобарической гипоксии по сравнению с контролем. Наибольшей активностью среди испытываемых препаратов обладали Пепт-9, Пепт-10 и Пепт-11, под влиянием которых на 21-й день после введения время жизни на «высоте» у экспериментальных животных было продлено более чем в 3 раза. Препараты Пепт-10 и Пепт-11 не только сохранили высокую антигипоксическую активность через 7 дней после прекращения их введения, но и превысили максимальный показатель, проявленный на 21-й день исследований. Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что исследуемые препараты пептидного происхождения и их комбинации являются антигипоксантами.

Ключевые слова: гипоксия, резистентность организма, антигипоксантами.

Успехи современной химии и фармакологии позволили осуществить синтез и внедрить в практику новый класс лекарственных средств – так называемых «антигипоксантов» – веществ, облегчающих реакцию организма на гипоксию, либо предотвращающих ее развитие, увеличивающих резистентность организма или отдельных органов к ней [1, 3]. Применение антигипоксантов оказалось действенным при многих видах хронических форм кислородной недостаточности [1, 2, 4, 5]. Однако большинство используемых в настоящее время антигипоксантов не обладают необходимой эффективностью в качестве средств экстренной помощи, преимущественно из-за медленной скорости развития терапевтического действия. Помимо этого, арсенал данных лекарственных средств пока крайне ограничен, а многие из них имеют узкий диапазон действующих доз и оказывают