

18. Cates C. J. In people with asthma inhalers one containing both formoterol and budesonide is better than current best practice? / C.J.Cates, C. Cartner // Кокрановская База данных Систематических Обзоров/ – 2013. – № 4 (Искусство). – No.: CD007313. DOI: 10.1002/14651858.CD007313.pub3 Posted on the web: May 31, – 2013.

19. Huchon G. Lung function and asthma control with beclomethasone and formoterol in a single inhaler / G.Huchon, H.Magnussen, A.Chuchalin et al. // Respir. Med. – 2009. – Vol. 103 (1). – P. 41–49.

20. Masoli M. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report / M.

Masoli, D.Fabian, S.Holt et.al. // Allergy. – 2004. – Vol. 59. – P. 469–478.

21. Murray C. J. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study / C.J.Murray, A.D.Lopez // Lancet. – 1997. – Vol. 349 (9064). – P. 1498–1504.

22. Pauwels R. A. Formoterol and Corticosteroids Establishing Therapy (FACET) International Study Group. Effect of inhaled formoterol and budesonide on exacerbations of asthma / R.A.Pauwels, C.G.Lofdahl, D.S.Postma et al. // N. Engl. J. Med. – 1997. – Vol. 337. – P. 1405–1411.

Поступила 16.01.2017

А. М. ЛАЗИЦКАЯ¹, Н. В. ЧМЕЛЕВСКАЯ¹, Е. А. ИЛЛАРИОНОВА²

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОФИЗОПАМА И ФЕНАЗЕПАМА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМАХ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

¹ Судебно-химическое отделение ГБУЗ Иркутское областное бюро судебно-медицинской экспертизы, Россия, 664022, г. Иркутск, Бульвар Гагарина 4; тел. +7 (3952) 22-93-90. E-mail: anlaz2005@yandex.ru

² Кафедра фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 664003, г. Иркутск, ул. Красного восстания; тел. 8 (914) 876-09-23. E-mail: Illelena24@rambler.ru

Разработаны оптимальные условия количественного анализа таблеток «Грандаксин» и таблеток «Феназепам», с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Нами в работе был использован хроматограф жидкостный микроколоночный «Милихром А-02», условия анализа: линейный градиент растворителя – 3700 мкл от 5 до 70 %, скорость потока 100 мкл/мин в системе лития перхлорат, кислота хлорная, вода и ацетонитрил, температура 40° С. В качестве контрольных веществ были использованы субстанции фармацевтические тофизопама и феназепам. Проведена валидационная оценка предложенных условий. Метод характеризуется хорошей линейностью с коэффициентом корреляции 0,9984 для тофизопама и 0,9991 для феназепам в диапазоне концентраций 0,025- 0,5 мг/мл. По разработанной методике определена относительная ошибка – 1,9 %.

Ключевые слова: тофизопам, феназепам, высокоэффективная жидкостная хроматография.

A. M. LAZITSKAYA¹, N. V. CHMELEVSKAYA¹, E. A. ILLARIONOVA²

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODS FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF TOFIZOPAM AND FENAZEPAM IN TABLETS METHOD OF HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

¹ Forensic chemical separation Irkutsk regional agency judicial-medical expert operation, Russia, Irkutsk 664022, Boulevard Gagarina 4; tel. +7 (3952) 22-93-90. E-mail: anlaz2005@yandex.ru

² Department of pharmaceutical and toxicological chemistry Irkutsk State Medical University Russian Ministry of Health, Russia, Irkutsk 664003, Krasnogo Vosstaniya str., 1; tel. 8 (914) 876-09-23. E-mail: Illelena24@rambler.ru

Developed optimal conditions of quantitative analysis of tablets "Grandaxinum" and tablets "Fenazepam", using the method high-performance liquid chromatography. We used microcolony liquid chromatograph "milichrom A-02", condition analysis: gradient elution in the system lithium perchlorate, perchloric acid, water and acetonitrile, gradient linear 3700 mkl from 5 to 70 % at a flow rate of 100 mkl/min and a temperature of 40° C. As a standard substances were used pharmaceutical substance tofizopama and phenazepam. Conducted a validation assessment of the proposed conditions. The method is characterized by good linearity with the correlation coefficient at 0.9984 for tofizopama and 0.9991 for phenazepam in the concentration range of 0.025 – 0.5 mg/ml. the relative error of determination by the developed technique does not exceed of 1.94 %.

Keywords: tofisopam, phenazepam, high-performance liquid chromatography, quantitative analysis.

Введение

Данные о потреблении лекарственных средств производных 1,4-бензодиазепина свидетельствуют, что до настоящего времени эти препараты остаются наиболее распространенными психотропными средствами. Показания к их назначению применительно к психическим расстройствам охватывают как субклинические, так и завершённые психопатологические состояния [1].

Количественное определение – это заключительный этап фармацевтического анализа, основной задачей которого является выбор оптимального метода. Нормативная документация [6,7,8] рекомендует для количественного определения тофизопама и феназепама в таблетках спектрофотометрический метод с использованием рабочего стандартного образца (PCO). Хроматографические методы в количественном анализе приобрели в настоящее время большую актуальность, в частности высокоэффективная жидкостная хроматография [4,5,9]. Метод дает возможность разделить малые количества веществ без каких-либо ограничений по их физико-химическим свойствам. Однако активное применение ВЭЖХ в повседневной практике ограничено некоторыми причинами, одна из которых – отсутствие унифицированных методик анализа [10].

Цель настоящей работы – разработать условия и провести валидацию методики количественного анализа тофизопама и феназепама в лекарственных формах методом ВЭЖХ.

Материалы и методы исследования

В данной работе был использован хроматограф жидкостный микроколоночный «Милихром А-02» (ЗАО «ЭкоНова», Новосибирск), детектор ультрафиолетовый спектрофотометрический, прибор укомплектован стальной колонкой (75x2 мм), которая заполнена обращенной фазой ProntoSIL-120-5-C18 AQ ("BischoffAnalysetechnikundGeräteGmbH", Германия) с размером частиц 5 мкм. Эффективность колонки – 3500 т.т., температура 40°C. В ходе пробоподготовки были использованы: рН метр «Анион 4100» (РФ), центрифуга «Eppendorf» (Германия), а так же субстанции тофизопама и феназепама в качестве стандартных (контрольных) веществ. Содержание основных веществ в субстанциях не ниже 98 %. В качестве растворителей использовали: лития перхлорат, ацетонитрил «о.с.ч» (сорт 1) фирмы «Криохром» (Санкт-Петербург), кислоту хлорную, спирт метиловый, квалификации не ниже «х.ч». Воду очищенную дополнительно обрабатывали, для этого применяли систему «Norganic, Millipore Corporation» (США). Для расчета достоверности были использованы критерии Стьюдента и Фишера [3] Рассчитанное значение критериев сравнили с граничным. Эмпирическое значение критерия равняется критическому значению $p=0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

Молекулы исследуемых лекарственных препаратов проявляют основные свойства за счет атомов азота с неподеленной парой электронов, что ведет к асимметрии их пиков на хроматограмме при нейтральных рН элюента. В связи с этим в работе использован полимерный сорбент ProntoSIL-120-5-C18 AQ, не проявляющий ионообменных свойств, что позволяет получать симметричные хроматографические пики основных соединений. Подвижная фаза состоит из двух элюентов: элюент А – [4 М LiClO₄–0,1 М HClO₄] – H₂O (5 : 95); элюент Б – ацетонитрил. Эти элюенты обладают высокой прозрачностью в коротковолновой области УФ-спектра и не содержат УФ-поглощающие примеси, проявляющиеся в виде "лишних" пиков на хроматограмме. Лития перхлорат в подвижной фазе способствует значительному улучшению формы и уменьшению ширины хроматографических пиков протонированных аминов (кислая среда, рН 2,8), что связано с подавлением ионообменных взаимодействий с остаточными силанольными группами адсорбента в присутствии катиона-конкурента Li⁺ [2]. Таким образом, для анализа таблеток тофизопама и феназепама была выбрана обращенно-фазовая хроматография.

Установлено, что исследуемые вещества в предложенных условиях хроматографируются в виде симметричных пиков. Свидетельством этого являются значения коэффициентов асимметрии, которые рассчитали на уровне 10 % высоты пиков. Коэффициенты асимметрии для определяемых соединений не превышают 1,5 (1,24- для тофизопама и 1,42- для феназепама). Таким образом, выбранные нами составы сорбента и элюента являются оптимальными для анализа тофизопама и феназепама.

Для регистрации УФ-спектров использовали стандартные растворы определяемых веществ с концентрацией 0,5 мг/мл. В качестве растворителя был использован спирт метиловый. Спектры регистрировали во время хроматографического анализа после остановки потока вблизи максимума пика в интервале длин волн 190 – 360 нм с шагом 2 нм. Для нормирования спектров длина волны 210 нм была выделена в качестве базовой [10]. Нормированные спектры тофизопама и феназепама представлены на рис.1 и 2.

Длины волн максимального, минимального поглощения и детектирования тофизопама и феназепама приведены в табл. 1.

Длины волн 220, 280, 300 нм использовались в качестве дополнительных, для расчета спектральных отношений, применение которых для идентификации пиков существенно повышает надежность идентификации исследуемых препаратов в пробах [10]. Хроматограммы стандартных растворов тофизопама и феназепама представлены на рисунках 3 и 4.

Времена удерживания тофизопама и фена-

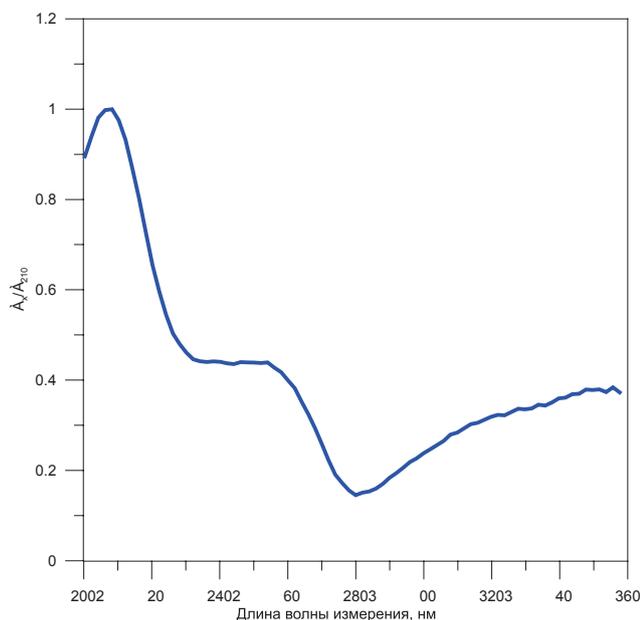


Рис.1. Нормированный УФ-спектры тофизопама

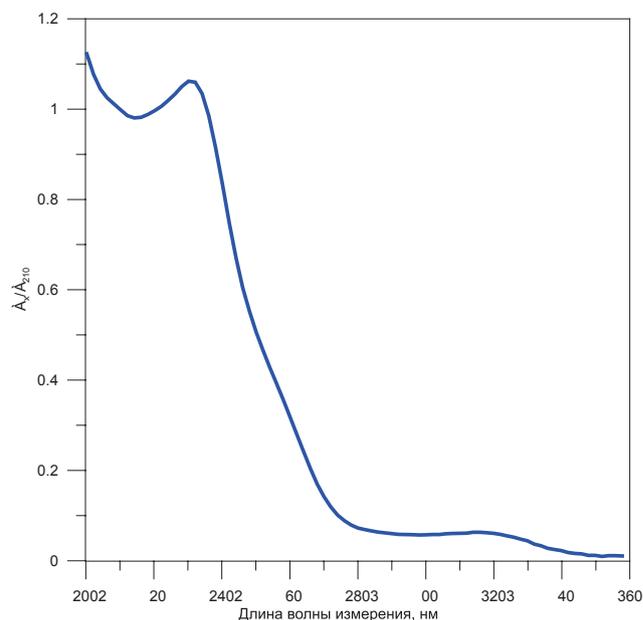


Рис.2. Нормированный УФ-спектры феназепама

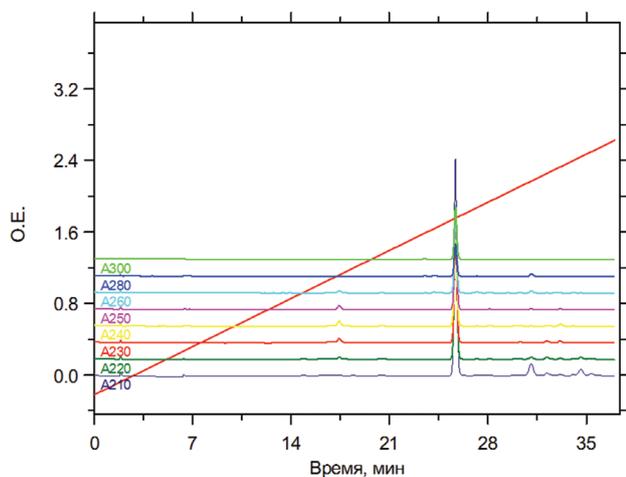


Рис. 3. Хроматограмма стандартного раствора тофизопама с концентрацией 0,5 мг/мл в метаноле.

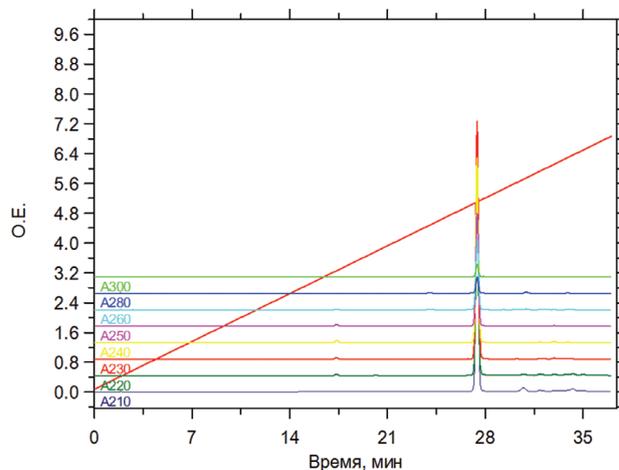


Рис. 4. Хроматограмма стандартного раствора феназепама с концентрацией 0,5 мг/мл в метаноле.

зепам составляет 25,68 и 27,41 минут соответственно.

Спектральные отношения основных хроматографических пиков для исследуемых соединений, рассчитанные как отношение площадей пиков, зафиксированные при длинах волн λ_x и λ_{210} приведены в табл. 2.

Проанализировав растворы модельных смесей с различными концентрациями тофизопама и феназепама, осуществили оценку линейности метода. Коэффициент корреляции составил 0,9984 для тофизопама и 0,9991 для феназепама в диапазоне концентраций 0,025–0,5 мг/мл, что свидетельствует о хорошей линейности.

Данные условия были использованы для разработки методик количественного анализа тофизопама и феназепама в таблетках с использованием внешнего стандарта, посредством сравнения площадей пиков исследуемых веществ и стандартных образцов. В качестве образца сравнения использовали фармацевтические субстанции

тофизопама и феназепама, перекристаллизованные из спирта метилового, содержание основного вещества в которых не ниже 99,9 %. Для расчета использовали программное обеспечение «МультиХром» (ЗАО «Амперсенд» г. Москва). Результаты количественного определения исследуемых веществ в лекарственной форме представлены в табл. 3.

Относительная ошибка определения исследуемых веществ по разработанной методике не превышает 1,9 %.

Проведена валидационная оценка предложенных условий для количественного определения исследуемых веществ в лекарственных формах (табл. 4).

Результаты, представленные в табл.4 показывают, что разработанные методики пригодны для анализа. Найденное содержание действующих веществ в таблетках соответствует требованиям нормативной документации [6,7,8]. Таким образом, для количественного определения тофизопама и фена-

Таблица 1

Длины волн максимального, минимального поглощения и детектирования тофизопама и феназепама. Растворитель: MeCN-0,2 M LiClO₄ (pH 2,8)

Определяемое вещество	λ_{\max} , нм	λ_{\min} , нм	$\lambda_{\text{дет}}$, нм
Тофизопам	208	плато 230, 280	210, 230, 240, 250, 260
Феназепам	230, 314	214, плато 292	

Таблица 2

Спектральные отношения для тофизопама и феназепама. Растворитель: MeCN- 0,2 M LiClO₄ (pH 2,8)

Определяемое соединение	Время удерживания, TR, мкл	Спектральное отношение, A(I)						
		A ₂₂₀ /A ₂₁₀	A ₂₃₀ /A ₂₁₀	A ₂₄₀ /A ₂₁₀	A ₂₅₀ /A ₂₁₀	A ₂₆₀ /A ₂₁₀	A ₂₈₀ /A ₂₁₀	A ₃₀₀ /A ₂₁₀
Тофизопам	2535	0,677	0,474	0,454	0,451	0,404	0,145	0,243
Феназепам	2709	1,002	1,067	0,840	0,508	0,305	0,060	0,055

Таблица 3

Количественное определение тофизопама и феназепама в таблетках

Лекарственная форма	№ серии	\bar{X} , %	Метрологические характеристики (n=7, P=95 %)						
			\bar{X} , %	S ²	S	S _x	D	E %	S _r
Грандаксин, таблетки 50 мг	6116A1113	0,0498	99,68	1,96	1,40	0,53	1,29	1,29	0,014
	1571A0114	0,0501	100,21	2,54	1,59	0,60	1,47	1,47	0,016
	6107A0113	0,0499	99,89	1,47	1,21	0,46	1,12	1,12	0,012
Феназепам, таблетки 1 мг	550512	0,0009	99,58	2,74	1,66	0,63	1,53	1,54	0,017
	630512	0,0009	98,39	4,26	2,06	0,78	1,91	1,94	0,021
	810612	0,0009	99,83	1,95	1,40	0,53	1,29	1,29	0,014

Таблица 4

Результаты валидационной оценки разработанной методики количественного определения тофизопама и феназепама в лекарственных формах

Параметры	Критерии	Результаты испытания	
		тофизопам	феназепам
Специфичность		методика специфична	методика специфична
Пригодность хроматографической системы			
Эффективность колонки	не менее 3000 т.т.	3500 т.т.	3500 т.т.
Коэффициент асимметрии пика	не более 2	1,24	1,42
Прецизионность:			
Сходимость	RSD ≤ 2,0 %	1,47	1,94
Воспроизводимость	RSD ≤ 2,0 %	2,11	2,32
Правильность	t _{выч} < t _{таб} (t _{таб} = 2,45), n=7	0,35	2,07
Линейность результатов	r ≥ 0,990	0,9984	0,9991
Стабильность раствора	индивидуально	в течение суток	в течение суток

зепам в лекарственных формах нами предложен метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детекцией при определенных условиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аведисова А. С., Ястребов Д. В., Костычева Е. А. Модель назначения производных бензодиазепина в амбулаторных лечебных учреждениях психиатрического профиля // Психиатрия и психофармакотерапия. – 2005. – № 2. – С. 63–68.
2. Барам Г. И., Грачев С. А. Использование перхлората лития при выделении и анализе олиго- и полинуклеотидов // Биорганическая химия. – 1985. – Т. 11. – № 10. – С. 1420–1422.
3. Государственная Фармакопея. – Т. 1. – 13-е. изд. – 2015. – 1470 с.
4. Иноземцев П. О., Илларионова Е. А. Высокоэффективная жидкостная хроматография в анализе капсул «Омез-Д» // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2015. – Т.132. – № 1. – С. 52–54.
5. Лубсандоржиева П. Б., Болданова Н. Б., Попов Д. В., Коли-

чественный анализ флавоноидов в растительном средстве методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2013. – № 1. – С. 114–115.

6. Нормативный документ 42-260-01. Грандаксин таблетки 50мг. – М., 2001. – 13 с.
7. Фармакоп. ст. предпр. ОАО «Валента Фармацевтика» 42-5293-08. Таблетки феназепам по 0,5мг, 1мг и 2,5мг. – М., 2008. – 15 с.
8. Фармакоп. ст. предпр. ЗАО «Мир – фарм» 42-0144603004. Таблетки феназепам по 0,5мг, 1мг и 2,5мг. – М., 2004. – 8 с.
9. Чмелевская Н. В., Илларионова Е. А., Федорова Г. А. Высокоэффективная жидкостная хроматография в анализе таблеток «Пикамилон» // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2013. – № 4. – С. 69–71.
10. Федорова Г. А., Кожанова Л. А., Полянская Е. М. Применение микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии в медицине. // Вестник восстановительной медицины. – 2008. – Т. 23. – № 1. – С. 35–41.

Поступила 26.01.2017

Э. А. МАЙЛАН

ПОКАЗАТЕЛИ ДЕНСИТОМЕТРИИ КОСТНОЙ ТКАНИ У ЖЕНЩИН В ПОСТМЕНОПАУЗАЛЬНОМ ВОЗРАСТЕ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛИМОРФИЗМА RS9594738 (C>T) ГЕНА TNFSF11

*Кафедра клинической иммунологии, аллергологии и эндокринологии Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького, 283003, г. Донецк, пр. Ильича, 16; тел. +38-095-578-72-27.
E-mail: mea095@yandex.ru*

Изучены показатели минеральной плотности костной ткани различных участков скелета у 483 женщин постменопаузального возраста в зависимости от генотипа полиморфизма rs9594738 (C>T) гена TNFSF11. Установлено, что женщины, имеющие генотипы СТ и ТТ, по сравнению с обладателями генотипа СС, характеризуются существенно сниженными ($P<0,001$ – $P=0,026$) показателями денситометрии в зоне поясничных позвонков L1-L4, проксимальных отделов левой и правой бедренных костей, в том числе шеек левого и правого бедра, а также дистального отдела костей предплечья. Результаты исследования могут быть использованы при разработке критериев для выявления предрасположенности к развитию постменопаузального остеопороза и повышения эффективности лечебно-профилактических мероприятий.

Ключевые слова: ген TNFSF11, rs9594738, женщины, постменопауза, остеопороз.

E. A. MAYLYAN

BONE DENSITOMETRY INDICATORS IN POSTMENOPAUSAL WOMEN DEPENDING ON TNFSF11 GENE RS9594738 (C>T) POLYMORPHISM

*Department of Clinical Immunology, Allergology and Endocrinology Donetsk National Medical University named after M. Gorky,
283003, Donetsk, Illich Ave., 16;
tel. +38-095-578-72-27. E-mail: mea095@yandex.ru*

Indexes of bone tissue mineral density of various sites of skeleton at 483 postmenopausal women depending on genotype of TNFSF11 gene rs9594738 (C>T) polymorphism were studied. It was established that women, who had CT and a TT genotypes in comparison with CC genotype owners were characterized by significantly lowered ($P<0,001$ – $P=0,026$) densitometry indexes in zone of L1-L4 lumbar vertebrae, left and right proximal femoral departments, including left and right femoral necks, and also forearm bones distal department. Results of this research can be used for development of