

УДК 573.086.83.002.56

СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО КОНТРОЛЮ КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ ДІЮЧИХ КОМПОНЕНТІВ КОМБІНОВАНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

Диль О. Д.¹
Виноградова К. Г.²

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка
²Лабораторія з контролю якості лікарських засобів ТОВ «Міжна-
родна об'єднана лабораторна група», Україна, Київ

Мінченко О. Г.³

³Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

E-mail: bizoshka@yandex.ru

Важливою умовою контролю якості комбінованих лікарських препаратів з різними діючими речовинами є ідентифікація цих активних компонентів та визначення їх кількості, а також виявлення і аналіз домішок. На основі високоефективної рідинної хроматографії розроблено ефективний метод контролю якості комбінованого лікарського препарату, діючими компонентами якого є леводопа та карбідопа, що мають подібну хімічну структуру і вміст яких у препараті різняться на порядок. Метод внесено в аналітичну нормативну документацію для проведення контролю у процесі виробництва готових форм препарату та вивчення його стабільності під час зберігання.

Ключові слова: високоефективна рідинна хроматографія, леводопа, карбідопа, контроль якості.

Для лікування порушень обміну речовин в організмі людини виробляється велика кількість різноманітних фармакологічних препаратів. Останнім часом дедалі ширше застосовують комбіновані лікарські засоби, в яких поєднується дія декількох компонентів з метою підвищення ефективності їхньої дії, а також засвоєння їх організмом. Виготовлення комбінованих, багатоконпонентних лікарських засобів є складним процесом і потребує різноманітних фармакологічних, технологічних та інших досліджень [1].

На цей час широкого застосування набули лікарські препарати, основу яких становлять природні амінокислоти та їх синтетичні аналоги. Саме ці компоненти і зумовлюють високу біологічну активність таких лікарських препаратів.

Досить ефективним препаратом, що його широко використовують у терапії хвороби Паркінсона є комбінований препарат, активними компонентами якого є синтетичні похідні тирозину. Одним із них є леводопа — аналог дофаміну, що являє собою (2S)-2-аміно-3-(3,4-дигідроксифеніл)-пропанову кислоту. Другим компонентом є (-)-L-α-гідразіно-α-метил-β-(3,4-діоксифеніл)-пропіонова кислота або карбідопа, яка справляє інгібуючу дію на декарбоксилазу дофаміну [2,3].

Надзвичайно важливою умовою контролю якості комбінованих лікарських препаратів з різними діючими речовинами є ідентифікація активних компонентів та визначення їх кількості, а також виявлення і аналіз домішок.

Досить часто для контролю кількості активних компонентів комбінованих лікарських препаратів неможливо застосувати традиційні методи кількісного та якісного контролю (титрування, фотометрію та ін.) у зв'язку з подібністю хімічної структури діючих речовин цих препаратів. Тому для вирішення цієї проблеми доцільно застосувати нові, більш чутливі методи аналізу, зокрема високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ) [4,5].

Метою роботи було розробити ефективний метод контролю якості комбінованого лікарського препарату, компонентами якого є леводопа та карбідопа.

Метод аналізу леводопи та карбідопи в комбінованому лікарському препараті

Однією з найпоширеніших лікарських форм у сучасній фармакопеї є таблетки. Перелік параметрів, за якими здійснюється контроль цієї лікарської форми, та вимоги до них описані у фармакопеях усіх країн.

Незважаючи на те, що кількість описаних методів надзвичайно велика, при створенні нової продукції щоразу постає питання стосовно розроблення методів контролю безпосередньо для даного лікарського засобу. Це передусім пов'язано як з особливостями складу препарату та технології його виготовлення, так і з можливостями лабораторій, що контролюватимуть процес виробництва та якість готової продукції [6–8].

Обов'язковими параметрами для контролю якості таблеток є: опис, ідентифікація, визначення середньої маси та її однорідність, наявність домішок, розпадання, розчинення, визначення вологості, однорідність дозування, кількісний вміст та мікробіологічна чистота. Залежно від особливостей готового лікарського засобу цей набір параметрів може варіювати з вилученням або додаванням деяких тестів [8–10].

Завдання нашого дослідження полягало в розробленні методів для проведення тестів: «Кількісне визначення», «Однорідність дозування», «Розчинення» та «Супровідні домішки». Беручи до уваги той факт, що діючих компонентів у препараті два: леводопа та карбідоба (з концентраціями, які різняться на порядок), потрібно було розробити такий метод контролю, за яким можна оцінити кількісний вміст кожного із цих компонентів за різних умов. Для цього препарату окрім тесту «Кількісне визначення» необхідно було ввести в аналітичну нормативну документацію (АНД) розділ «Однорідність дозування», що пов'язано з вимогами Державної фармакопеї України (ДФУ) для таблеток із вмістом діючої речовини менше 50 мг. Такою речовиною у препараті є карбідоба. Вміст діючої речовини слід перевіряти не тільки у зразку розтертих таблеток, а й безпосередньо в окремій таблетці (на 10 або 30 одиницях дозованої форми) [8, 11].

Контроль якості таблеток передбачає обов'язкове виконання тесту «Розчинення». Для цього проводять кількісне визначення діючих речовин, які можуть вивільнитись у середовище розчинення в разі використання специфічного обладнання. Цей тест, з одного боку, імітує поведінку препарату в шлунково-кишковому тракті і є показником того, що пацієнт дійсно отримає необхідну речовину після приймання таблетки, а з другого — є підтвердженням відтворення процесу виробництва від серії до серії. Розроблення тесту «Розчинення» потребує встановлення багатьох параметрів та вимог залежно від умов проведення тесту та вимог до

ступеня розчинності (об'єм розчинника, швидкість обертання лопаті чи кошика, час розчинення та регламентований процент вивільнення). У даному разі розробляючи метод розчинення застосовували параметри, зазначені як базові у ДФУ. Оскільки препарату не притаманне пролонговане вивільнення, а також, ґрунтуючись на даних його фармакодинаміки, час розчинення становив 30 хв при швидкості обертання лопаті 50 об/хв. Для більш раціонального проведення контролю якості розраховували концентрацію, яка б збігалася з концентрацією для кількісного визначення діючих речовин та однорідності дозування. Об'єм середовища розчинення становив 750 мл. Провівши тестування розчинення за таких умов на таблетках дослідної серії, визначили, що цей тест є придатним і ступінь вивільнення перевищує 95%, а це вкладається у фармакопейні норми (75–115%). Після проведення серії таких тестів у специфікацію заклали норматив із вужчими межами з метою гарантування якості — не менше 80% діючої речовини має вивільнитись у розчин за 30 хв. Встановлення більш жорстких параметрів не суперечить регламенту фармакопеї [8, 12].

З метою оптимізації робочого часу та зменшення економічних витрат для проведення трьох тестів — «Кількісне визначення», «Однорідність дозування» та «Розчинення» — слід було розробити метод, умови якого гарантують одержання вірогідних результатів для кожного тесту. Для вирішення цього завдання беззаперечним є використання методу високоефективної рідинної хроматографії. Вимоги, що їх належало виконати при цьому, такі: умови проведення хроматографії мають гарантувати чітке розділення леводопи, карбідопи та тирозину, який є продуктом розщеплення перших двох компонентів; на визначення вмісту діючих речовин не повинна впливати присутність інших продуктів розщеплення цих речовин, які можуть утворюватись у процесі кислотного або лужного гідролізу, під впливом окисників та/або ультрафіолетового опромінювання (фотоліз) [13].

Для виконання тесту «Кількісне визначення» використано відомості про контроль якості леводопи та карбідопи, описані в чинних фармакопеях для кожної із цих сполук, і дані, що їх було надано виробниками субстанцій. У процесі вивчення спектрів діючих речовин у 0,1 М розчині хлористоводневої кислоти виявлена можливість дослідження обох діючих речовин при довжині хвилі 280 нм (рис. 1).

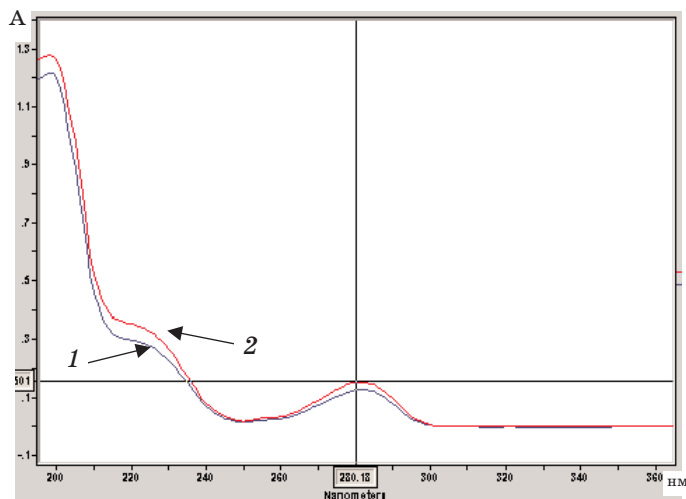


Рис. 1. Спектри поглинання розчинів леводопа та карбідопа в 0,1 М розчині НСІ:
1 — леводопа; 2 — карбідопа

Дослідження впливу концентрованих розчинів хлористоводневої кислоти, гідроксиду натрію, пероксиду водню та ультрафіолетового випромінювання на леводопа та карбідопа показало, що лужний гідроліз може призвести до повного розщеплення леводопа. Враховуючи той факт, що для виконання тесту «Розчинення» як імітатор шлункового середовища використовували 0,1 М розчин хлористоводневої кислоти, можна було спрогнозувати, що для виконання хроматографії рН рухомої фази буде нейтральним або кислим. Розпочавши підбір умов із традиційного співвідношення 50:50 органічного та неорганічного компонентів, одержали результати, які не дозволили розділити леводопа та карбідопа. Зменшення кількості органічного компонента рухомої фази сприяло більшому поділу

між піками досліджуваних речовин, однак навіть за 10%-го вмісту органічного компонента не було досягнуто повного розділення піків леводопа та тирозину (рис. 2) [13,14].

Повне вилучення органічного компонента дало змогу досягти коефіцієнта розділення між основними компонентами 24 і відділити пік основної домішки — тирозину від піка леводопа (до коефіцієнта 6). Це уможливило відділення усіх інших домішок від основних компонентів. Дослідження впливу рН рухомої фази на розділення діючих речовин показало, що найкращих результатів можна досягти при рН 2,8. Це пов'язано з тим, що досліджувані компоненти препарату більш стійкі при кислому значенні рН. Зміна швидкості потоку рухомої фази не впливала на ступінь їх розділення, але, як можна побачити з табл. 1, втрачається якість показників кількості теоретичних тарілок (КТТ) та фактора симетрії піка (ФС), оскільки при низьких швидкостях тривалість аналізу була надто велика [14].

Перевіряючи стабільність досліджуваних розчинів та здійснюючи хроматографічний аналіз протягом доби, встановили, що для карбідопа змінюється симетрія піка та час утримування. Для вирішення цієї проблеми до рухомої фази було додано розчин іонпарного реагенту. З даних, наведених у табл. 2, можна зробити висновок, що це помітно стабілізує фактор симетрії та час утримування і, як наслідок, кількість теоретичних тарілок упродовж довготривалого аналізу. Концентрацію іонпарного реагенту в досліджуваних розчинах було обрано рівною 1 мМ у зв'язку з тим, що збільшення його концентрації не змінювало хроматографічні характеристики досліджуваних речовин [15].

Особливе значення для розроблення методу кількісного визначення діючих речовин

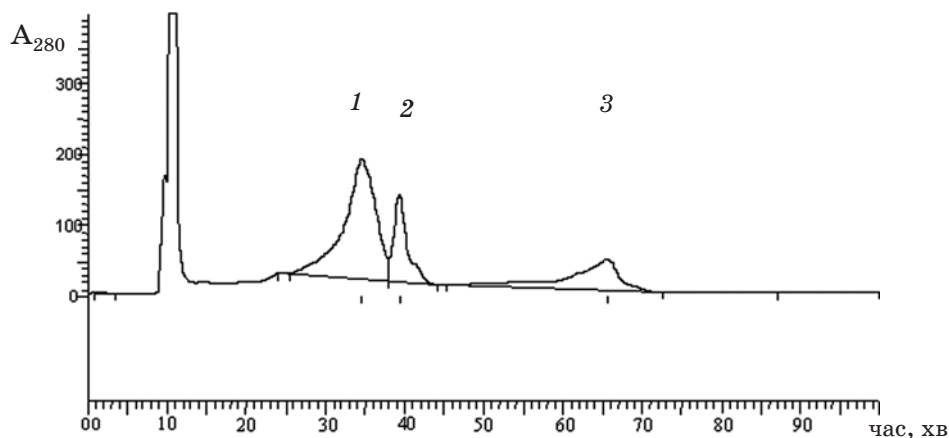


Рис. 2. Профіль елюції розчину, який містить стандартні зразки леводопа, карбідопа та тирозину за 10%-го вмісту органічного компонента в рухомій фазі:
1 — леводопа; 2 — тирозин; 3 — карбідопа

Таблиця 1. Вплив швидкості рухомої фази на показники хроматографічного аналізу

Швидкість, мл/хв	Леводопа			Карбідоба		
	КТТ	ФС	Час утримування, хв	КТТ	ФС	Час утримування, хв
0,5	1280±12	2,92±0,5	8,3±0,1	523±18	3,5±0,1	30,5±0,8
0,7	2527±14	1,91±0,4	5,1±0,2	1085±29	2,7±0,2	21,3±0,2
1,0	7803±10	1,07±0,3	4,0±0,1	5890±20	1,2±0,1	16,4±0,4
1,3	3005±5	0,68±0,7	3,1±0,3	3040±15	0,9±0,1	15,7±0,3
1,5	3150±17	0,50±0,5	2,8±0,2	2100±12	0,6±0,3	10,1±0,2

Примітка. Тут і в табл 2: КТТ — кількість теоретичних тарілок; ФС — фактор симетрії піка.

Таблиця 2. Вплив наявності в рухомій фазі іонпарного реагенту на показники хроматографічного аналізу

Термін проведення аналізу, год	Без іонпарного реагенту			З іонпарним реагентом		
	КТТ	ФС	Час утримування, хв	КТТ	ФС	Час утримування, хв
0	5930±12	1,2±0,2	16,4±0,3	5950±15	1,2±0,1	16,4±0,1
1	4220±18	1,3±0,1	16,8±0,5	5890±16	1,2±0,2	16,4±0,1
5	3981±24	1,8±0,3	17,3±0,9	5907±19	1,3±0,2	16,5±0,2
10	2550±70	2,0±0,5	18,5±1,4	5753±15	1,3±0,1	16,4±0,3

має встановлення умов приготування проби, зокрема розчинів, які вивчаються. Необхідно було підібрати такі умови, за яких діюча речовина повністю переходить у розчин. Розчинники мають бути такі, що не впливатимуть на умови хроматографії та на хроматографічні характеристики. Для цього, насамперед, варто виходити з хімічних властивостей досліджуваних сполук. Згідно з фармакопейними даними, леводопа малорозчинна у воді, практично нерозчинна у 96% -му спирті та ефірі, легко розчиняється в 1 М хлористоводневій кислоті та помірно — в 0,1 М хлористоводневій кислоті. Карбідоба малорозчинна у воді, ще меншою мірою розчинна в 96% -му етанолі та практично нерозчинна у метиленхлориді. Розчинність, згідно з вимогами ДФУ, визначають так: 1 г сполуки, що є легкорозчинною, має розчинятись у 10–30 мл розчинника (тобто концентрація її в розчині має бути 0,03–0,10 г/мл); 1 г сполуки, яка є помірно розчинною, має розчинятись у 30–100 мл розчинника (тобто концентрація її в розчині має бути 0,01–0,03 г/мл). Концентрація леводопи у розчинах, які вивчали під час розроблення методу, становила 0,0005 г/мл, концентрація карбідопи — відповідно 0,00005 г/мл. У разі приготування таких розчинів у 0,1 М хлористоводневій кислоті

самі сполуки розчинялись повністю, однак у розчинах, які готували з таблеток або з порошку розтертих таблеток, не вся сполука переходить у розчин. Це пов'язано з тим, що до складу таблетки як допоміжні речовини входять різні види крохмалю та мікрористалічна целюлоза. Саме ці сполуки можуть затримувати вивільнення досліджуваних речовин з твердої лікарської форми. Тому для аналізу було підібрано концентрацію розчину, за якої на першому етапі аналізу у реакційне середовище додавали певну кількість 1 М хлористоводневої кислоти, після оброблення ультразвуком пробу довели до мітки водою, що створювало кінцеву концентрацію кислоти в розчиннику 0,1 М.

Таким чином, розроблено умови контролю якості двокомпонентного препарату з діючими речовинами леводопа та карбідоба з виконанням тестів «Кількісне визначення», «Однорідність дозування», «Розчинення» та «Супровідні домішки» методом високо-ефективної рідинної хроматографії. Розраховано показники придатності хроматографічної системи для тест-аналізів (табл. 3). Метод внесено в аналітичну нормативну документацію для проведення контролю у процесі виробництва готових форм препарату та вивчення його стабільності під час зберігання.

Таблиця 3. Хроматографічні умови, які увійшли до аналітичної нормативної документації

Показник	Значення показника
Хроматографічна колонка	Заповнена октадецилсилілікагелем для хроматографії, розміром 125x4 мм, розмір частинок 5 мкм, або аналогічна, для якої виконуються вимоги тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи»; використано колонку Purospher RP18e виробництва фірми Merck
Детектування	Довжина хвилі 280 нм
Рухома фаза	0,08 М розчин натрію дигідрофосфату моногідрату з іонпарним реагентом, дегазований будь-яким зручним способом; рН рухомої фази 2,8
Швидкість рухомої фази	1,0 мл/хв
Температура колонки	30 °С
Об'єм ін'єкції	20 мкл
Концентрація діючих речовин у розчинах для хроматографування	Леводопа — 0,5 мг/мл; карбідоба — 0,05 мг/мл

ЛІТЕРАТУРА

1. *Машковский М. Д.* Лекарства двадцатого века. — М.: Новая Волна, 1998. — 320 с.
2. *Технология и стандартизация лекарств:* Сборник научных трудов. — Х.: РИРЕГ, 1996. — 784 с.
3. *Губський Ю. І.* Біоорганічна хімія. — Вінниця: Нова книга, 2004. — 464 с.
4. *Стискин Е. Л., Ицксон Л. Б., Брауде Е. В.* Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. — М.: «Химия», 1986. — 205 с.
5. *Хедтман Е., Кастер Т.* Хроматография: практическое применение метода: В 2 ч. — М.: Мир, 1986. — 335 с.
6. *European Pharmacopoeia 2002.* — 4th edition. — Strasbourg, 2001. — 1287 p.
7. *The United States Pharmacopoeia.* — XXVIII ed. — Convention Inc, 2005. — 2149 p.
8. *Державна Фармакопея України.* — 1-ше вид. — Х.: РИРЕГ, 2001. — 556 с.
9. *Государственная Фармакопея СССР.* — XI изд. — Вып. 1. — М.: Медицина, 1987. — 336 с.
10. *Государственная Фармакопея СССР.* — XI изд. — Вып. 2. — М.: Медицина, 1990. — 400 с.
11. *Державна Фармакопея України.* — 1-ше вид. Доповнення 1. — Х.: РИРЕГ, 2004. — 494 с.
12. *Good Manufacturing Practices for Pharmaceutical Products.* WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparation. Thirty second Report. (WHO technical report series, №823). — Geneva: World Health Organization, 1992. — 14–79 p.
13. *Benson J. R. Woo D.* Chromatographic Methods. // *Chromatogr. Sci* 1984. — V. 22, N 9. — 386–399 p.
14. *Parris N. A.* Instrumental Liquid Chromatography. — 2nd ed. Elsevier: Oxford, 1984. — 267 p.
15. *Daas A. G. J., Miller M. B.* Relationship Between Content Limits System Suitability for Precision and Acceptance/Rejection Criteria for Assays Using Chromatographic Methods // *Pharmeuropa.* — 1999. — V. 11, N4. — P. 571–577.

**СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ
К КОНТРОЛЮ КОЛИЧЕСТВЕННОГО
СОДЕРЖАНИЯ ДЕЙСТВУЮЩИХ
КОМПОНЕНТОВ КОМБИНИРОВАННЫХ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

*А. Д. Дыль¹
К. Г. Виноградова²
А. Г. Минченко³*

¹Киевский национальный университет
имени Тараса Шевченко

²Лаборатория контроля качества лекар-
ственных средств ТОВ «Международная объеди-
ненная лабораторная группа», Украина, Киев

³Институт биохимии им. А.В. Палладина
НАН Украины, Киев

E-mail: bizoshka@yandex.ru

Важным условием контроля качества комбинированных лекарственных препаратов с различными действующими веществами является идентификация этих активных компонентов и определение их количества, а также выявление и анализ примесей. На основе высокоэффективной жидкостной хроматографии разработан эффективный метод контроля качества комбинированного лекарственного препарата, действующими компонентами которого являются леводопа и карбидопа, которые имеют сходную химическую структуру и содержание которых в препарате различается на порядок. Метод внесен в аналитическую нормативную документацию для проведения контроля качества во время производства готовых форм препарата и определения его стабильности при хранении.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, леводопа, карбидопа, контроль качества.

**MODERN APPROACHES FOR THE QUAN-
TITATIVE CONTENTS CONTROL
OF FUNCTIONAL COMPONENTS
OF COMBINED MEDICAL DRUGS**

*O. D. Dyl¹
K. G. Vinogradova²
O. H. Minchenko³*

¹Taras Shevchenko Kyiv National University

²Laboratory for the quality control of med-
ical drugs TOV «International United
Laboratory Group», Kyiv

³Palladin Institute of Biochemistry of National
Academy of Sciences, Kyiv

E-mail: bizoshka@yandex.ru

The condition of the quality control of combined medical drugs with different active components was developed. Identification of active components as well as determination of its quantity are important for the quality control. The effective method of the quality control of combined medical drugs was developed using high-performance liquid chromatography. This method was applied for identification of the levodopa and carbidopa which have similar chemical structure as well as impurities (tyrosine). The method was included into the analytical normative documentation for the quality control of combined medical drugs during manufacturing and storage.

Key words: high performance liquid chromatography, levodopa, carbidopa, quality control.