



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Химический факультет
Кафедра аналитической химии

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ АНАЛИЗА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ «АЗАМЕТОНИЯ БРОМИД» ПО ПОКАЗАТЕЛЮ «ПОСТОРОННЫЕ ПРИМЕСИ»

Научный руководитель: зав. ЛФХМА ТГУ Новиков Д. В.

Выполнила: студентка гр.08601 Пак Е. В.

Томск-2019

Актуальность

- Ранее поставляемый из Китая азаметония бромид (известный как пентамин) стало возможно производить в РФ.
- Требуется регулирующая его чистоту методика анализа, соответствующая нынешней Фармакопее РФ.
- Из всех методов выбран ТСХ как самый простой в выполнении, дешевый, времясберегающий и подходящий для разделения близкородственных органических веществ.
- В литературе не найдено удовлетворительных методик анализа.
- Ранее была начата, но не провалидирована новая методика.



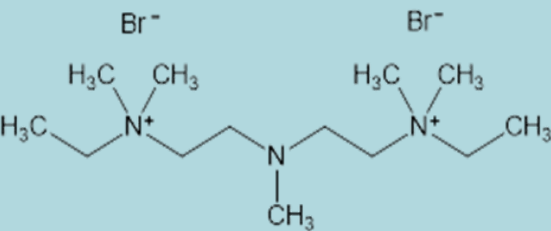
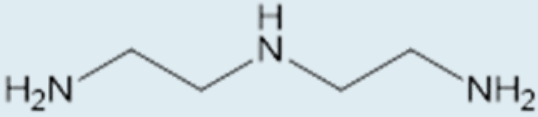
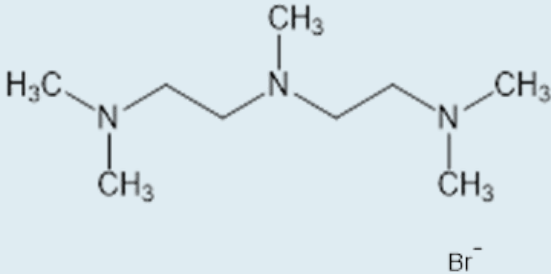
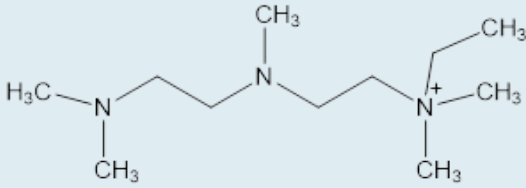
Рис. 1 – Упаковка ампул раствора азаметония бромида

Цель работы

Доработка и валидация ранее разработанной полуколичественной методики ТСХ для определения посторонних примесей в азаметионе бромиде.



Таблица 1. Возможные посторонние примеси в азаметонии бромиде.

Название вещества	Формула	Влияние на организм	Примечание
Азаметония бромид		В малых дозах – медикамент с широким спектром применения (при гипертонии, астме, заболеваниях ЖКТ; нейрохирургия)	Целевой продукт
Диэтилентриамин (DETA)		Разъедающее, удушающее, десенсибилизирующее действие, вызывает отек легких и впоследствии астму	Исходный продукт синтеза
Пентаметил-диэтилентриамин (PMDTA)		Раздражающее и разъедающее действие, вызывает конвульсии, головную боль, рвоту, язвы слизистых и отек легких	Промежуточный продукт синтеза
Моноэтилированное производное		Неизвестно, вероятно разъедающее слизистые и раздражающее дыхательные пути	Промежуточный продукт синтеза

Описание исходной методики

- Автор: А.А. Андреева (студентка группы № 08406):
- Пластины («Sorbfil» серии ПТСХ-П) предварительно активировали в течение 1 часа при +110 °С. На высоте 10 мм от края пластины наносили по 5 мкл испытуемых растворов (нагрузка на пятно – 6 мкг пентамина на 5 мкл). Пластину высушивали при +110 °С в течение 10 минут и помещали в камеру, предварительно заполненную элюентом (6М соляная кислота – метанол – этилацетат в соотношении 1:1:3) и насыщенную в течение 90 минут. Хроматографировали пластину восходящим методом. После того, как фронт подвижной фазы прошел путь 8 см, пластину вынимали, высушивали при +110 °С в течение 10 минут и проявляли (реактив Драгендорфа согласно фармакопейной методике).

Воспроизведение методики

- Были обнаружены крупные темные бесформенные пятна, появляющиеся на хроматограмме после опрыскивания реактивом и затрудняющие визуальное определение пятен примесей.
- Также было обнаружено сильное размывание основного пятна вдоль пластины, нарушающее условие удовлетворительного хроматографического анализа.

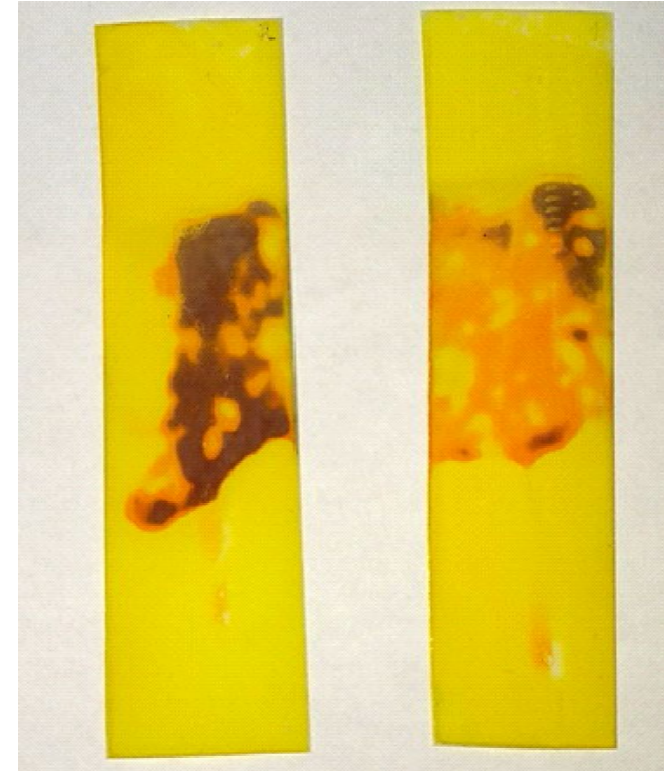


Рис. 2 – Хроматограммы воспроизведения исходной методики

Влияние состава элюента

- Пластины с нанесенными пятнами исследуемого раствора (6 мкг/5 мкл) были помещены в чистые 6М и 4М HCl, метанол и этилацетат.
- На одной из пластин, погруженных в 6М HCl после проявления были замечены обуглившиеся пятна по краям, однако не воспроизведенные на второй пластине; пятна в середине пластины не обнаружены.
- На пластинах этилацетата и метанола пятно не сдвинулось с нулевой линии, обугленных или темных пятен не наблюдалось.
- При уменьшении концентрации соляной кислоты (самый полярный кислый компонент подвижной фазы) с 6М до 4М в составе исходного элюента R_f пентамина стремится к нулю, ее исключение из элюента невозможно.

Влияние типа пластинок

- При использовании пластин Sorbfil ПТСХ-П-А образуются темные пятна и сильно размывается пятно исследуемого вещества.
- При использовании пластин Sorbfil ПТСХ-П-В темных пятен почти не образуется, пятна анализируемых веществ правильной круглой формы, но не проявляется требуемый от фармакопейных методик $PO = 0,15 \text{ мас.}\%$.



Рис. 3 – Пластины Sorbfil ПТСХ-П-В, использованные при анализе

Влияние состава проявителя

- **Концентрат реактива Драгендорфа (фармакопейная методика):**
 - Раствор I. К 0,85 г висмута нитрата основного прибавляют 40 мл воды, 10 мл уксусной кислоты, концентрированной и взбалтывают в течение 15 мин.
 - Раствор II. 8 г калия йодида растворяют в 20 мл воды.
 - Растворы I и II смешивают (основной раствор).
- **Реактив Драгендорфа модифицированный:** непосредственно перед применением 5 мл основного раствора смешивают с 5 мл 1% водного раствора аскорбиновой кислоты и 5 мл спирта 96 %.
- Было установлено, что увеличение чувствительности напрямую связано с уменьшением объема концентрата в реактиве Драгендорфа, и был сделан вывод, что отношение концентрата к разбавляющим составляющим, равное 5 мл к 10 мл, слишком велико.
- В литературе описаны модификации реактива, имеющие итоговое разбавление концентрата 1 к 12 (модификация по Мунье). При дальнейшем разбавлении повышения ПО не наблюдалось.

Влияние состава проявителя

- Появление темно-бурых пятен вероятно связано с выделением свободного йода в результате побочных реакций йодида калия, являющегося частью проявляющего реактива. Аскорбиновая кислота, обладающая восстановительными свойствами, стабилизирует выделившийся йод и осветляет фон, что повышает чувствительность анализа.
- **Реактив Драгендорфа с аскорбиновой кислотой:** 1 мл концентрированного раствора разбавляют 2 мл уксусной кислоты и 10 мл 0,2%-ного водного раствора аскорбиновой кислоты.
- При использовании модификации с аскорбиновой кислотой наблюдается более светлый и равномерный фон пластины.

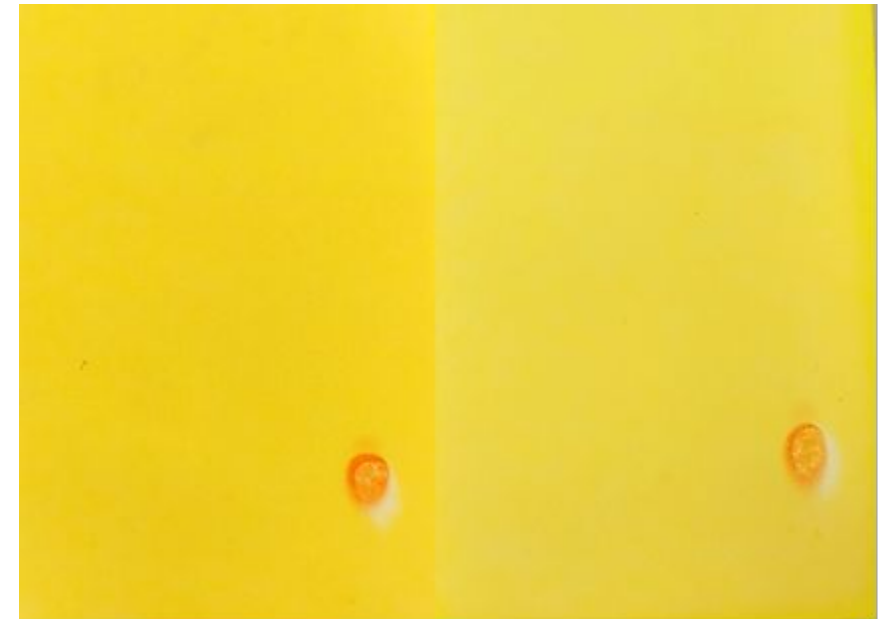


Рис. 4 – Сравнение хроматограмм, опрысканных реактивом Драгендорфа по фармакопейной методике без (слева) и с добавлением аскорбиновой кислоты (справа)

Идентификация примесей

- Для определения разделяющей способности методики были приготовлены модельные смеси и нанесены пятна:
 - 6 мкг/5 мкл пентамина и 6 мкг/5 мкл PMDTA (смесь 1);
 - 6 мкг/5 мкг пентамина и 1 мкг/5 мкл PMDTA (смесь 2);
 - смесь 2, разбавленная до содержания пентамина в 0,012 мкг/5 мкл = 0,2% мас. от исходной концентрации.



Рис.5 – Хроматограмма проверки разделения примесей
Примечание: пятно 1 – 6 мкг/5 мкл пентамина и PMDTA; пятно 2 – 0,012 мкг/5 мкл пентамина; пятно 3 – 6 мкг/5 мкг пентамина и 1 мкг/5 мкл PMDTA

Оценка предела обнаружения

- Для проверки предела обнаружения методики были приготовлены растворы с концентрацией пентамина 6 мкг/5 мкл = 100%, 0,15% и 0,1% (мас.)
- Пятно с концентрацией 0,1% (мас.) не наблюдается.
- ПО методики изменен на 0,15% (мас.).
- Отмечается, что со временем пластины выцветают. Визуальное детектирование необходимо проводить сразу же после проявления.



Рис.6 – Хроматограмма проверки ПО
Примечание: пятно 1 – 0,1%; пятно 2 – 0,15%;
пятно 3 – 6 мкг/5 мкг = 100% мас. пентамина

Оценка специфичности

- Для проверки разделяющей способности была приготовлена модельная смесь, содержащая:
 - пентамин (6 мкг/5 мкл);
 - пентаметилдиэтилентриамин (0,15% от концентрации пентамина);
 - моноэтилированное промежуточное соединение (находится в исходной сухой субстанции пентамина в неизвестном количестве).

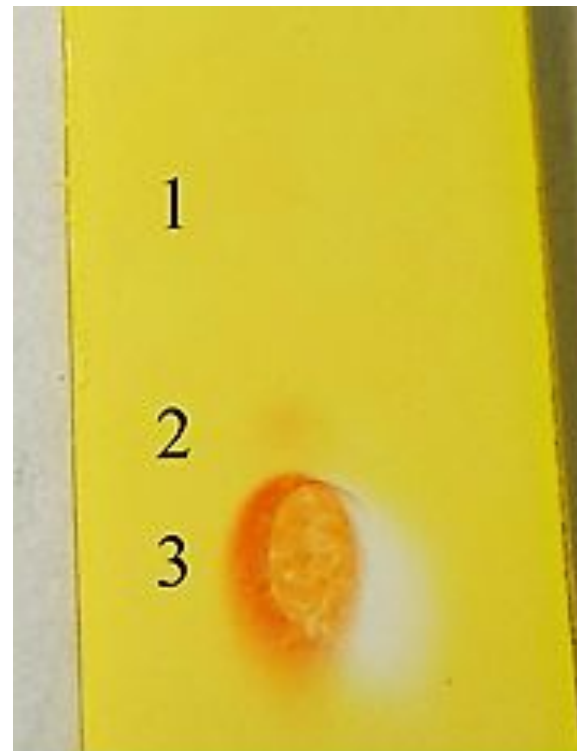


Рис.7 – Хроматограмма проверки специфичности
Примечание: пятно 1 – РМДТА, пятно 2 –
моноэтилированное производное, пятно 3 – пентамин

Итоговая методика

- **Испытуемый раствор:**

- Испытуемый раствор должен иметь концентрацию 1,2 г/л, что соответствует оптимальной нагрузке на пятно, равной 6 мкг на 5 мкл. Готовится из сухой смеси путем взятия навески аналитической точности (с учетом массовой доли влаги) или из раствора с точно известным массовым содержанием пентамина.

- **Раствор сравнения:**

- Готовится из испытуемого раствора путем разбавления до концентрации, равной 0,15% (мас.) от исходной.

- **Реактив Драгендорфа:**

- Раствор I. К 0,85 г висмута нитрата основного прибавляют 40 мл воды, 10 мл уксусной кислоты, концентрированной и взбалтывают в течение 15 мин.
- Раствор II. 8 г калия йодида растворяют в 20 мл воды.
- Растворы I и II смешивают. Для обработки хроматограммы 1 мл полученного раствора разбавляют 2 мл уксусной кислоты и 10 мл 0,2%-ного водного раствора аскорбиновой кислоты.

Итоговая методика

- **Выполнение анализа:**

- Пластины («Sorbfil», ПТСХ-П-В) предварительно активировали в течение 1 часа при +110 °С. На высоте 10 мм от края пластины наносили 5 мкл испытуемого раствора (нагрузка на пятно – 6 мкг на 5 мкл) и раствора сравнения (0,15 мас.% от испытуемого раствора). Пластину высушивали при +110 °С в течение 10 минут и помещали в камеру, предварительно заполненную элюентом (6 М соляная кислота – метанол – этилацетат в соотношении 1:1:3) и насыщенную в течение 90 минут. Хроматографировали пластину восходящим методом. После того, как фронт подвижной фазы прошел путь 8 см, пластину вынимали, высушивали при +110 °С в течение 10 минут и проявляли реактивом Драгендорфа, приготовленным по ранее указанной методике.

- **Обработка результатов:**

- Непосредственно после проявления проводится визуальная оценка окраски пятен: интенсивность пятен, соответствующих примесям, не должна превышать интенсивность пятна раствора сравнения. В таком случае принимается, что содержание единичной примеси меньше или равно 0,15% (мас.) от массы пентамина.

Выводы

- Была воспроизведена и доработана исходная методика анализа азаметония бромида.
- Был подобран проявляющий реактив с удовлетворительной чувствительностью к исследуемым веществам.
- Пригодность методики анализа подтверждена по валидационным характеристикам «Специфичность» и «Предел обнаружения» (ПО = 0,15%).