

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЕРАПАМИЛА В ГЕЛЕ МЕТОДОМ ПЛАНАРНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Мезенова Т.Д.¹, Ушакова Л.С.¹, Леонова В.Н.¹, Жидкова Ю.Ю.², Пенъевская Н.А.²

¹Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет», Пятигорск, Россия (357532, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11), e-mail: Mezenova@yandex.ru

²ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия», Омск, Россия (644099, г. Омск, ул. Ленина, 12)

Разработана методика идентификации и количественного определения верапамила в геле. Использовали метод тонкослойной хроматографии с видеоденситометрической регистрацией аналитического сигнала. Для хроматографирования использовали пластинки марки «Sorbfil ПТСХ-АФ-В-УФ» размером 10x15 см. Подвижная фаза - система растворителей «ацетон - вода очищенная» (8:2). Детектирующий реагент – реактив Бушарда. На жёлтом фоне реактива появляются пятна коричневого цвета с R_f 0,55±0,01. Предел обнаружения реагента 0,4 мкг. Валидация методики количественного анализа проведена по следующим критериям: чувствительность, линейность, правильность, и сходимость результатов. Градуировочный график описывается уравнением $S = 1,69 \cdot 10^4 m$; коэффициент корреляции $r = 0,995$ в интервале концентраций 0,5–2 мкг/мл. Правильность методики определяли методом «введено-найдено» на 5 уровнях концентраций стандартного образца (RSD = 3,73%). Предел обнаружения количественного определения - 1,2 мкг. Сходимость оценивали по результатам повторного определения содержания верапамила в разных растворах и на разных пластинках. Данным методом определено 0,93±0,057 г верапамила в 100 г геля (RSD = 5,9%). Полученные данные свидетельствуют, что методика специфична, имеет достаточно высокую чувствительность и эффективность. Методика количественного определения отвечает необходимым требованиям по показателям чувствительность, линейность, правильность и сходимость.

Ключевые слова: верапамил, тонкослойная хроматография, видеоденситометрия, идентификация, количественное определение.

THE DETERMINATION OF VERAPAMIL IN THE GEL BY THE METHOD OF PLANAR CHROMATOGRAPHY

Mezenova T.D.¹, Uschakova L.S.¹, Leonova V.N.¹, Zhidkova U.U.², Penyevskaya N.A.²

¹Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute - the branch of the Volgograd State Medical University, mail:Mezenova@yandex.ru

²Omsk state medical Academy, Omsk

The technique of identification and quantitative determination of verapamil in the gel has been developed. The analytical signal was used the method of thin-layer chromatography with videodensitometric registration. The plate marks «Sorbfil PTSH-AF-V-UV» size 10x15 cm was used out for the chromatography. The mobile phase is the solvent system of acetone-purified water (8:2). The reagent of Bouchard is the detecting reagent. Brown spots with R_f of 0,55±0,01 appear on a yellow background reagent. The limit of detection reagent is 0,4 mcg. The validation of methods of quantitative analysis has been carried out according to the following criteria: sensitivity, linearity, accuracy and precision of results. The calibration curve is described by the equation $S = 1,69 \cdot 10^4 m$; the correlation coefficient of by the $r = 0,995$ in the concentration range of 0,5 - 2 mcg/ml. The accuracy of the technique was determined by the method «input – found» on the 5 levels of concentration of standard sample (RSD = 3,73%). The detection limit of quantitative determination is 1,2 mcg. Convergence was assessed by the results of the second content determination of verapamil in different solutions and different plates. is 0,93±0,057 g of verapamil in 100 g of gel has been defined by this method (RSD = 5,9%). The data obtained indicate that the technique is specific, has a sufficiently high sensitivity and efficiency. Technique for quantitative determination meet the standards in terms of sensitivity, linearity, accuracy and precision.

Keywords: verapamil, thin layer chromatography, videodensitometry, identification, quantitative determination.

Одним из способов лечения рубцов и шрамов является использование различных кремов, мазей и гелей, содержащих вещества антирубцового действия. Верапамил даёт положительный результат при лечении и профилактике образования келоидных и

гипертрофированных рубцов [4]. Компоненты геля, содержащего верапамил, имеют близкие максимумы светопоглощения в УФ-области, поэтому непосредственно каждое лекарственное вещество методом УФ-спектрофотометрии идентифицировать и количественно определить не представлялось возможным. В связи с этим нами была разработана методика идентификации и количественного определения верапамила методом тонкослойной хроматографии с денситометрической регистрацией аналитического сигнала.

Цель работы. Разработать методику идентификации и количественного определения верапамила в геле, в 100 г которого содержится 1 г данного вещества.

Материал и методы исследования. В качестве растворителя геля был выбран ацетон. При растворении в ацетоне образуется прозрачный бесцветный раствор. Для хроматографирования использовали пластинки марки «Sorbfil ПТСХ-АФ-В-УФ» для высокоэффективной тонкослойной хроматографии размером 10x15 см. Подвижной фазой служила система растворителей «ацетон - вода очищенная» (8:2) [2]. Хроматографирование проводили в стеклянной камере, насыщенной парами растворителя. Для приготовления стандартного образца (СО) 0,0125 г верапамила (ФС 42-0224-07) (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 25,0 мл, растворяли в ацетоне и доводили ацетоном раствор до метки. Концентрация СО верапамила составила 0,5 мкг/мл.

Приготовление раствора геля: около 1,25 г (точная навеска) геля помещали в мерную колбу вместимостью 25,0 мл, растворяли в ацетоне и доводили ацетоном раствор до метки.

На линию старта хроматографической пластинки длиной 15 см наносили раствор СО с содержанием верапамила 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75 мкг в пятне. На этой же пластинке обозначали линии контрольных треков, на которые наносили ацетоновый раствор геля объемом 3,0 мкл. Пробы наносили при помощи микрошприца МШ-10. Пластинки помещали в камеру для хроматографирования объемом 2000 см³, насыщенную парами растворителя. После подъема растворителя на необходимый уровень пластинки вынимали, высушивали в вытяжном шкафу при комнатной температуре до удаления паров растворителя. Длина пробега растворителя около 8 см. Детектирующий реагент – реактив Бушарда. На жёлтом фоне реактива появляются пятна коричневого цвета с $R_f 0,58 \pm 0,01$.

Необходимо учитывать, что пятна очень неустойчивы и после высыхания пластинки обесцвечиваются. Поэтому сразу после проявления в мокром виде пластинки сканировали при помощи планшетного сканера «HP Scanjet 3670» (разрешение 100 dpi) и далее осуществляли ее цифровую обработку с помощью компьютерной программы «Видеоденситометр Sorbfil» (г. Краснодар).

Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки (внешнего стандарта), по градуировочному графику зависимости «масса вещества – площадь пика»

(линейная аппроксимация). Статистическая обработка результатов проводилась в соответствии с ОФС «Статистическая обработка результатов химического эксперимента и биологических испытаний» [1].

Результаты исследования и их обсуждение

Определение хроматографических характеристик.

Чувствительность детектирующего реагента устанавливали по величине предела обнаружения (ПО), который рассчитывали с учётом стандартного отклонения сигнала и углового коэффициента градуировочного графика. ПО составляет 0,4 мкг. Специфичность определяли по величине R_f пятна контрольного трека, которая должно соответствовать R_f пятен стандартного образца ($0,58 \pm 0,01$). На треках контрольного образца визуально обнаруживалось пятно коричневого цвета с R_f , соответствующей стандартным образцам (рис. 1, 2).

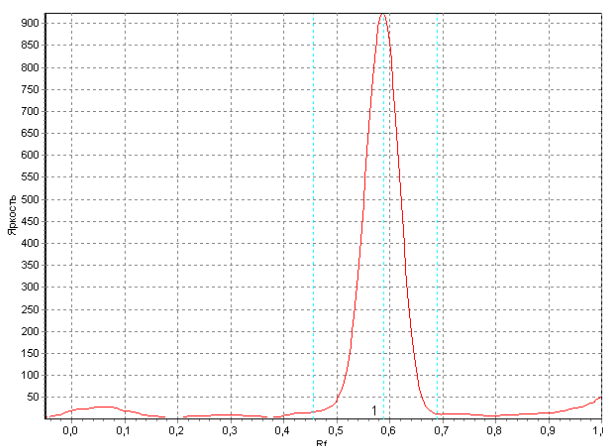


Рис. 1. Хроматограмма СО верапамила.

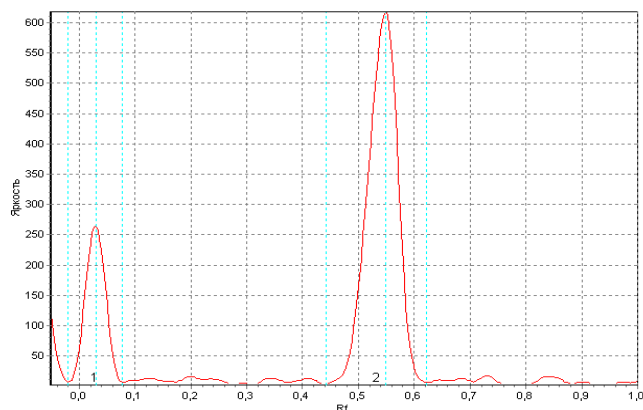


Рис. 2. Хроматограмма ацетонового раствора геля (2 – верапамил).

Эффективность пластинки около 800 теоретических тарелок.

Валидация методики количественного анализа проведена по следующим критериям: чувствительность количественного определения, линейность, правильность и сходимость результатов [5].

Линейность устанавливали по градуировочным графикам, полученным при компьютерной обработке хроматограмм в координатах площадь пика (S) – масса (m, мкг). Под площадью пика в видеоденситометрии понимается интегральная характеристика, включающая собственно площадь пятна, его объём в пространстве и интенсивность его окраски [3]. По данным градуировочных графиков рассчитывали статистические характеристики и коэффициент корреляции. Методом наименьших квадратов определяли значимость свободного члена линейной зависимости (a), углового коэффициента (b) и чувствительность количественного определения. Расчеты проводили с помощью программы Microsoft Excel. В диапазоне концентраций 0,5-2,0 мкг в пятне наблюдается прямолинейная зависимость. Градуировочный график описывается уравнением $S=1,69 \cdot 10^4 m$, коэффициент корреляции $r = 0,995$ (рис. 3).

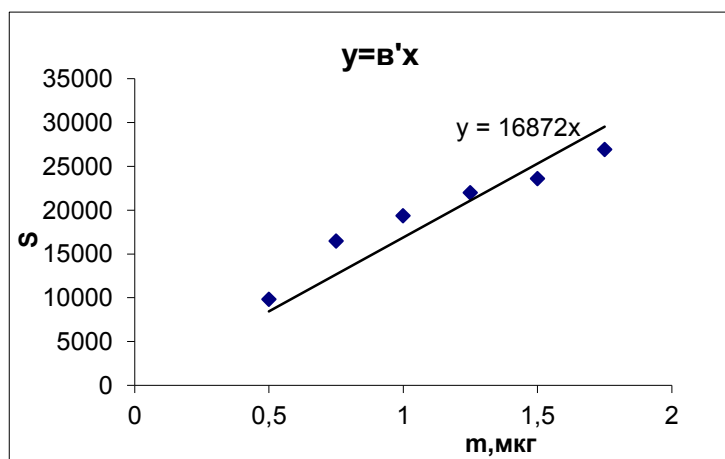


Рис. 3. Градуировочный график верапамила.

Предел количественного определения (quantitation limit), рассчитанный по величине стандартного отклонения сигнала и углового коэффициента градуировочного графика, составляет 1,2 мкг.

Правильность методики определяли методом «введено-найдено». По уравнению градуировочного графика рассчитывали содержание верапамила на 5 уровнях концентраций СО и определяли метрологические характеристики (табл. 1).

Оценка правильности определения верапамила

Уровень	Взято, мкг	Найдено, мкг	Открываемость, %	Метрологические характеристики
1	1,0	1,03	103	$X_{cp} = 101$ $SD = 1,67$ $\Delta X = 3,77$ $RSD = 5,22\%$ $E\% = 3,73\%$
1	1,0	1,12	112	
2	1,5	1,52	101	
2	1,5	1,41	94	
3	2,0	1,90	95	
3	2,0	2,04	102	
4	2,5	2,50	100	
4	2,5	2,38	98	
5	3,0	3,18	106	
5	3,0	2,97	99	

Сходимость методики оценивали по результатам повторного определения содержания верапамила в геле. Результаты и метрологические характеристики представлены в таблице 2.

Таблица 2

Результаты определения верапамила в геле. Оценка сходимости

Содержание верапамила в геле, г/100 г	Метрологические характеристики
0,90	$X_{cp} = 0,925$ $\Delta X = 0,057$ $SD = 0,055$ $RSD\% = 5,9\%$ $E\% = 6,2\%$
1,01	
0,94	
0,85	
0,9	
0,95	

Выводы. В результате проведённых исследований разработана методика идентификации и количественного определения верапамила в геле методом планарной хроматографии на пластинках марки ПТСХ-П-В-УФ. Полученные данные свидетельствуют, что методика специфична, имеет достаточно высокую чувствительность и эффективность. Методика количественного определения отвечает необходимым требованиям по показателям чувствительность, линейность, правильность и сходимость.

Список литературы

1. Государственная фармакопея РФ. – XII изд. – М., 2007. – Ч. I. – 697 с.
2. Кормишин В.А. Денситометрический анализ верапамила в судебно-химической экспертизе / Кормишин В.А., Воронин А.В., Шаталаев И.Ф. // Вопросы науки и техники : материалы Международной заочной научно-практической конференции (16 января 2012 г.). – Новосибирск : ЭКОР-книга, 2012. – Ч. I. - С. 31–35.
3. Красиков В.Д. Основы планарной хроматографии. – СПб. : Химиздат, 2005. – 232 с.
4. Федотов В.К., Скальский С.В., Ковалевский А.А. Антирубцовый крем : патент 2290919 РФ № 2004121762/15; заявл. 15.07.2004; опубл. 2007. Бюл. № 1.
5. Руководство ICN «Валидация аналитических методик». Содержание и методология // Фармация. – 2008. – № 4. – С. 3-10.

Рецензенты:

Коновалов Д.А., д.ф.н., профессор кафедры фармакогнозии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО «Волг ГМУ», г. Пятигорск;

Компанцева Е.В., д.ф.н., профессор кафедры фармацевтической химии и токсикологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО «Волг ГМУ», г.Пятигорск.