

УДК 535.372; 615.453.6; 615.074

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕНИБУТА В ТАБЛЕТИРОВАННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВАХ

О.И. Лазовская¹, В.Н. Леонтьев^{1*}, Е.В. Литвинова²

Резюме. Разработанная методика количественного определения фенибута в таблетированных лекарственных средствах основана на реакции дансильирования в щелочной среде (pH 9,18), приводящая к образованию флуоресцирующего производного с $\lambda_{исп}=505$ нм и $\lambda_{возб}=335$ нм. Подобраны оптимальные условия для полного протекания реакции: температура и время термостатирования (40 °С и 15 мин), молярное соотношение фенибута и дансилхлорида (1:1,4). Методика валидирована по показателям специфичности, линейности, прецизионности и правильности. График зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации фенибута в диапазоне 800–1200 нг/мл описывается уравнением регрессии $y=0,1003x+1,4685$ ($r=0,9999$). Предел обнаружения и предел количественного определения методики составили 29,55 и 89,54 нг/мл соответственно.

Ключевые слова: флуоресцентная спектроскопия, дансилхлорид, фенибут, таблетированное лекарственное средство, валидация.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A SPECTROFLUORIMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF PHENIBUT IN TABLET DRUGS

O.I. Lazovskaya¹, V.N. Leontiev^{1*}, E.V. Litvinova²

Abstract. The developed method for the quantitative determination of phenibut in tablet drugs is based on the dansylation reaction in an alkaline medium (pH 9.18). The reaction results in the formation of a fluorescent derivative with $\lambda_{em}=505$ nm and $\lambda_{ex}=335$ nm. Optimal conditions were selected to complete the reaction: temperature and time of thermostating (40 °C and 15 min), molar ratio of phenibut and dansyl chloride (1:1.4). The method was validated in parameters of specificity, linearity, precision and accuracy. A plot of fluorescence intensity versus concentration of phenibut over the range of 800–1200 ng/ml is described by the regression equation $y = 0.1003x + 1.4685$ ($r = 0.9999$). The limit of detection and limit of quantification were 29.55 and 89.54 ng/ml respectively.

Keywords: fluorescence spectroscopy, dansyl chloride, phenibut, tablet drug, validation.

1 – Учреждение образования «Белорусский государственный технологический университет», 220006, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Свердлова, 13а

2 – РУП «Белмедпрепараты», 220007, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Фабрициуса, 30

1 – Belarusian State Technological University, 13a, Sverdlova str., Minsk, 220006, Republic of Belarus

2 – RUE «Belmedpreparaty», 30, Fabritsius str., Minsk, 220007, Republic of Belarus

* адресат для переписки:

E-mail: leontiev@belstu.by

Тел.: + 375 17 327 28 03

ВВЕДЕНИЕ

Фенибут (γ -амино- β -фенилмасляная кислота) – анксиолитическое и ноотропное средство, оказывающее транквилизирующее и психостимулирующее действие. Способствует снижению чувства тревоги, напряженности, беспокойства и страха, нормализует сон, повышает физическую и умственную работоспособность, улучшает память [1].

По химической структуре фенибут является фенильным производным нейромедиатора γ -аминомасляной кислоты [2]. В связи с наличием хирального β -углеродного атома у γ -амино- β -фенилмасляной кислоты существуют R- и S-энантиомеры. Субстанция фенибута, используемая для производства лекарственных средств, представляет собой рацемическую смесь. При-

чем R-изомер в 100 раз терапевтически более активен, чем S-изомер [3].

Известны следующие методы количественного определения фенибута в лекарственных средствах: прямое спектрофотометрическое измерение интенсивности поглощения электромагнитного излучения ароматическим хромофором при 257 нм [4], спектрофотометрический метод определения фенибута по продукту его реакции с нингидрином при 568 нм [5], метод капиллярного электрофореза [6], метод высокоэффективной жидкостной хроматографии [7].

Самым высокочувствительным методом, позволяющим детектировать очень низкие концентрации веществ (10^{-6} – 10^{-9} моль/л), является флуоресцентная спектроскопия [8]. Однако фенибут не имеет собственного флуорофора, поэто-

му его количественное определение возможно только по продуктам реакции с 5-(диметиламино)нафтален-1-сульфонилхлоридом (дансилхлорид) или 4-хлор-7-нитробензофуразаном. Эти соединения, взаимодействуя с первичными и вторичными аминами, образуют интенсивно флуоресцирующие продукты [9–12].

Цель данной работы – разработать и валидировать методику спектрофлуориметрического определения фенибута в таблетированных лекарственных средствах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Спектрофлуориметр FP-8500 (JASCO Corporation, Япония); жидкостной термостат Тур У8 (VEB MLW Prüfgerate-Werk, Германия); аналитические весы AS 220/C/2/N (Radwag Wagi Elektroniczne, Польша).

Препараты и реактивы

Фенибута гидрохлорид (фенибут), субстанция-порошок, содержание фенибута 99,6% (Common Results Inc., Китай); лекарственное средство «Фенибут, таблетки 250 мг» (РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь); дансилхлорид [х.ч., CAS № 605-65-2, Sigma Aldrich, США]; ацетон [х.ч., CAS № 67-64-1, Sigma Aldrich, США]; натрий тетраборат декагидрат [х.ч., CAS № 1303-96-4, Sigma Aldrich, США].

Испытуемый раствор фенибута готовили следующим образом. Из порошка 20 тщательно растертых таблеток отбирали 500 мг и растворяли в 50 мл дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 100 мл, перемешивали в течение 10 мин и доводили объем тем же растворителем до метки. Полученную смесь фильтровали через двойной бумажный складчатый фильтр «синяя лента», отбрасывая первую порцию фильтрата. Затем 4 мл полученного фильтрата помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем дистиллированной водой до метки и перемешивали. Отбирали 1 мл полученного раствора и помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем тем же растворителем до метки и перемешивали. Раствор использовали свежеприготовленным.

Растворы субстанции фенибута для построения калибровочного графика готовили следующим образом. Растворяли 250 мг субстанции фенибута в 50 мл дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводили объем тем же растворителем до метки и перемешивали. Аликвоту полученного раствора 4 мл помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем дистиллированной водой до метки и перемешивали. Затем, выполняя соответствующие разведения полученного раствора с концентрацией 0,1 мг/мл, готовили растворы субстанции фенибута с концентрациями 800, 900, 1000, 1100 и 1200 нг/мл.

Растворы дансилхлорида в ацетоне готовили исходя из 1,4-кратного мольного избытка реагента по от-

ношению к фенибуту в испытуемом растворе, а при построении калибровочного графика – по отношению к фенибуту в соответствующих растворах субстанции. Растворы хранили в темном прохладном месте.

Боратный буферный раствор 0,01 М (рН 9,18) готовили, растворяя 3,81 г $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ дистиллированной водой в мерной колбе вместимостью 1000 мл [13].

Методика количественного определения

Испытуемый раствор фенибута объемом 1 мл помещали в мерную пробирку с притертой пробкой вместимостью 10 мл, добавляли 3 мл боратного буферного раствора, 1 мл раствора дансилхлорида и 1 мл ацетона. Быстро и тщательно перемешивали. Полученную смесь инкубировали в термостате при 40 °С в течение 15 мин. Затем измеряли интенсивность флуоресценции в максимуме полосы испускания при $\lambda_{\text{исп}}=505$ нм ($\lambda_{\text{возб}}=335$ нм) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см против холостой пробы. Содержание фенибута в лекарственном средстве рассчитывали по уравнению регрессии с учетом разведений.

Для построения калибровочного графика определяли интенсивность флуоресценции продукта реакции дансирования фенибута в растворах субстанции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие фенибута с дансилхлоридом приводит к образованию флуоресцирующего производного по уравнению реакции (рисунок 1).

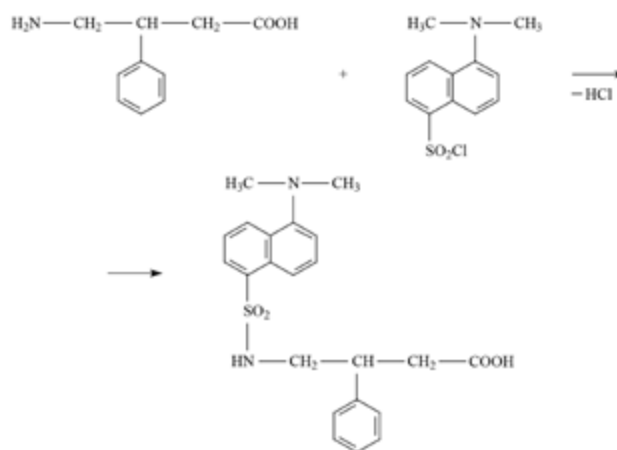


Рисунок 1. Уравнение реакции взаимодействия фенибута с дансилхлоридом

Спектры возбуждения и испускания флуоресцирующего продукта с максимумами при $\lambda_{\text{возб}}=335$ нм и при $\lambda_{\text{исп}}=505$ нм соответственно представлены на рисунке 2.

С целью определения условий полного протекания реакции было изучено влияние температуры и времени термостатирования, мольного соотношения фенибута и дансилхлорида.

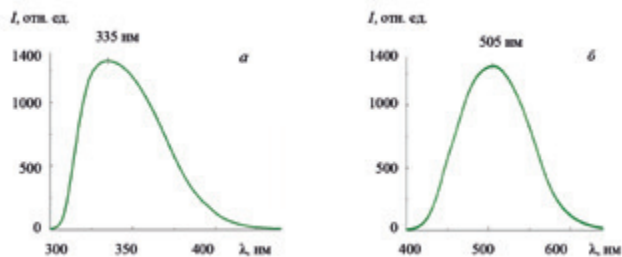


Рисунок 2. Спектры возбуждения (а) и испускания (б) флуоресцирующего продукта реакции фенибута с дансилхлоридом

Согласно [14] реакция дансирования первичных и вторичных аминов протекает в водно-ацетоновой среде при pH 9–11, поэтому для исследований нами было выбрано значение pH в данном диапазоне: pH 9,18.

Влияние температуры и времени термостатирования на полноту реакции дансирования изучали при 20–40 °С в течение 40 мин. Как видно из рисунка 3а, кинетические кривые при 20 и 25 °С не выходят на стационарную фазу, в то время как кинетические кривые при 30, 35 и 40 °С выходят на плато через 30, 20 и 10 мин соответственно. В связи с этим были выбраны наиболее оптимальные по температуре и рациональные по времени условия проведения реакции дансирования: 40 °С и 15 мин.

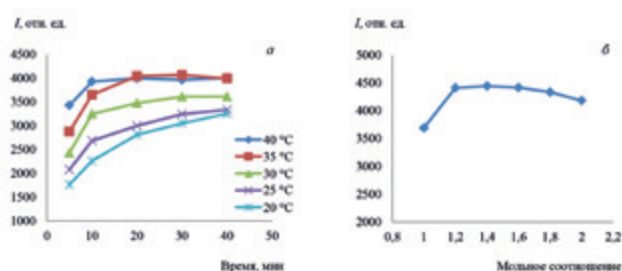


Рисунок 3. Влияние температуры и времени термостатирования (а), молярного соотношения реагентов (б) на реакцию дансирования

Необходимое количество реагентов определяли, изменяя их молярное соотношение от 1:1 до 1:2, при этом 1,2–1,4-кратный избыток дансилхлорида являлся достаточным для того, чтобы весь фенибут вступил в реакцию (рисунок 3б). Для дальнейших исследований нами было выбрано молярное соотношение реагентов 1:1,4.

Валидацию разработанной методики количественного определения фенибута в лекарственном средстве с применением флуоресцентной спектроскопии проводили по следующим характеристикам: специфичность, линейность, прецизионность, правильность. Чтобы продемонстрировать высокую чувствительность методики, были исследованы такие валидационные параметры, как предел обнаружения и предел количественного определения [15]. Статистическую обработку полученных результатов выполня-

ли с использованием программы Microsoft Office Excel 2010.

Специфичность методики определяли путем сравнения интенсивности флуоресценции испытуемого раствора фенибута и раствора плацебо при $\lambda_{исп}=505$ нм и $\lambda_{возб}=335$ нм. Установлено, что присутствие вспомогательных веществ не мешает определению фенибута в лекарственном средстве.

Для определения линейности использовали 5 растворов субстанции с концентрациями 80, 90, 100, 110 и 120% от номинального содержания фенибута, принятого за 100% (1000 нг/мл с учетом разведения). Установлено, что аналитическая область методики, находящаяся в диапазоне 800–1200 нг/мл, входит в пределы линейной зависимости и описывается уравнением регрессии $y=0,1003x+1,4685$ с коэффициентом корреляции $r=0,9999$; пересечение с осью Y составляет 1,44% отклика от номинальной концентрации (рисунок 4).

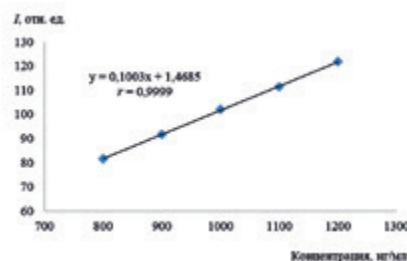


Рисунок 4. Калибровочный график зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации фенибута

Прецизионность методики оценивали на двух уровнях: повторяемость и внутрилабораторная воспроизводимость.

Статистическая обработка полученных результатов представлена в таблице 1.

Таблица 1.

Статистическая обработка результатов анализа (n=6, P=0,95)

Метрологический показатель	Прецизионность	
	Повторяемость	Внутрилабораторная воспроизводимость
Среднее значение, мг	251,10	252,07
Дисперсия S^2	11,32	12,54
Стандартное отклонение S	3,36	3,54
Относительное стандартное отклонение RSD, %	1,34	1,40
Доверительный интервал среднего значения Δ , мг	3,53	3,72
Относительная ошибка определения среднего значения, %	1,41	1,47

Разность наибольшего x_{max} и наименьшего x_{min} результатов испытаний не должна превышать значения предела повторяемости $L(P, m) \cdot S$, где $L(P, m)$ – фак-

тор, вычисленный по Пирсону при $P=0,95$ и $m=2$. Относительное стандартное отклонение RSD, полученное при оценке повторяемости, должно быть не более 2%, при оценке внутрилабораторной воспроизводимости – не более 3%.

Правильность методики определяли путем сравнения вычисленного значения критерия Стьюдента табличным $t_{\text{таб}}$:

$$t_{\text{выч}} = |\bar{x} - \mu| \sqrt{n/S},$$

где μ – истинное значение содержания фенибута в лекарственном средстве.

Результаты валидационных испытаний методики количественного определения фенибута в лекарственном средстве представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Результаты валидационных испытаний методики

Валидационный показатель и его критерий приемлемости	Полученное значение	Критическое значение
Специфичность: • компоненты плацебо не должны искажать результат	Соответствует	–
Линейность: • коэффициент корреляции r • пересечение с осью Y (%) отклика от номинальной концентрации	0,9999 1,44	$\geq 0,99$ ≤ 2
Повторяемость: • предел повторяемости: ($x_{\text{max}} - x_{\text{min}}$) $\leq 2,77 \cdot S$ • относительное стандартное отклонение RSD, %	8,1 1,34	$\leq 9,32$ ≤ 2
Внутрилабораторная воспроизводимость: • относительное стандартное отклонение RSD, %	1,40	≤ 3
Правильность: • критерий Стьюдента: $t_{\text{выч}} \leq t_{\text{таб}}$	0,8	$\leq 2,57$

Предел обнаружения (ПО) и предел количественного определения (ПКО) методики рассчитывали по следующим уравнениям:

$$\text{ПО} = 3,3 \cdot S_a/b,$$

$$\text{ПКО} = 10 \cdot S_a/b,$$

где S_a – стандартное отклонение свободного члена линейной зависимости; b – тангенс угла наклона калибровочной прямой.

Значения ПО и ПКО составили 29,55 нг/мл ($1,4 \cdot 10^{-7}$ моль/л) и 89,54 нг/мл ($4,2 \cdot 10^{-7}$ моль/л) соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучена реакция взаимодействия фенибута с дансилхлоридом, приводящая к образованию флуоресцирующего производного с $\lambda_{\text{исп}}=505$ нм и $\lambda_{\text{возб}}=335$ нм. Подобраны оптимальные условия для полного протекания реакции дансилирования – температура и время термостатирования (40 °C и 15 мин), мольное соотношение фенибута и дансилхлорида (1:1,4).

Разработана методика спектрофлуориметрического определения фенибута в таблетированных лекарственных средствах. Проведены валидационные испытания, в ходе которых установлены специфичность, линейность, прецизионность и правильность методики. Показана высокая чувствительность предлагаемой методики: ПО=29,55 нг/мл, ПКО = 89,54 нг/мл.

Работа выполнена в рамках задания «Разработать научно-методические основы количественного определения действующих веществ в лекарственных средствах методами колебательной и флуоресцентной спектроскопии» подпрограммы «Фармакология и фармация» Государственной программы научных исследований «Химические технологии и материалы» на 2016–2020 годы (Республика Беларусь).

ЛИТЕРАТУРА

1. М.Д. Машковский. Лекарственные средства. – М.: Новая волна, 2012. 1216 с.
2. I. Lapin. Phenibut (beta-phenyl-GABA): a tranquilizer and nootropic drug // CNS Drug Reviews. 2001. V. 7. № 3. P. 471–481.
3. M. Dambrova, L. Zvejniece, E. Liepinsh et al. Comparative pharmacological activity of optical isomers of phenibut // European Journal of Pharmacology. 2008. V. 583. № 1. P. 128–134.
4. L. Logoyda, D. Korobko, N. Zarivna et al. Development of methodology for the spectrophotometric determination of phenibut in drugs // 19th Dubai International Pharmaceuticals and Technologies Conference and Exhibition, March 10–12, 2014. – Dubai. 2014. P. 157.
5. Б.В. Боровский. Валидационная оценка спектрофотометрической методики количественного определения фенибута в таблетках по реакции с нингидрином // Научное обозрение. 2013. № 4. С. 222–225.
6. Ю.А. Полковникова, У.А. Тульская. Разработка методики количественного определения фенибута в микрокапсулах // Материалы V Всероссийской научно-практической конференции «Беликовские чтения», 6–7 декабря 2016 г. – Пятигорск. 2016. С. 66–68.
7. L. Logoyda, D. Korobko, N. Zarivna. Development of methodology for the determination of phenibut in medicines / 2nd Chemical Engineering and Chemical Technologies Conference, October 23–25, 2014. – Istanbul. 2014. P. 141–153.
8. Н.Л. Векшин. Флуоресцентная спектроскопия биополимеров. – Пущино: Фотон-век, 2014. 188 с.
9. Z. Aydogmus, F. Sari, S.T. Ulu. Spectrofluorimetric determination of aliskiren in tablets and spiked human plasma through derivatization with dansyl chloride // Journal of Fluorescence. 2012. V. 22. № 2. P. 549–556.
10. E.S. Aktas, L. Ersoy, O. Sagirli. A new spectrofluorimetric method for the determination of lisinopril in tablets // IL Farmaco. 2003. V. 58. № 2. P. 165–168.
11. N. El-Enany, F. Belal, M. Rizk. Spectrofluorimetric determination of oxamniquine in dosage forms and spiked human plasma through derivatization with 1-dimethylaminonaphthalene-5-sulphonyl chloride // Journal of Fluorescence. 2008. V. 18. № 2. P. 349–355.
12. G. Iskender, S. Atmaca. Spectrofluorimetric determination of nortriptyline hydrochloride with NBD-Cl in pharmaceutical dosage forms // Journal of Pharmacy of University of Marmara. 1986. V. 2. № 1. P. 69–76.
13. ГОСТ 8.135-2004. Государственная система обеспечения единства измерений. Стандарт-титры для приготовления буферных растворов – рабочих эталонов pH 2-го и 3-го разрядов. Технические и метрологические характеристики. Методы их определения. – М.: Стандартинформ, 2005. 12 с.
14. F. Garcia Sanchez, C. Cruces Blanco. Determination of the insecticide promecarb by fluorogenic labelling with dansyl chloride // Analyst. 1991. V. 116. № 8. P. 851–856.
15. А.А. Шеряков. Государственная фармакопея Республики Беларусь. Т. 1. Общие методы контроля качества лекарственных средств. – Молодечно: Победа, 2012. 1220 с.