



УДК 615.22:543

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИКОРАНДИЛА

**Д.И. ПИСАРЕВ
О.О. НОВИКОВ
Л.М. ДАНИЛЕНКО**

*Белгородский
государственный
национальный
исследовательский
университет*

e-mail: novikov@bsu.edu.ru

Настоящая работа посвящена разработке аналитических подходов, обеспечивающих адекватную оценку качества никорандила. Для этого авторами использованы методы ОФ ВЭЖХ и УФ-спектроскопии с помощью которых разработаны методы качественного и количественного определения никорандила. Сравнительный анализ показал сопоставимость использованных методов в оценке качества никорандила по критериям экспрессности и воспроизводимости. По критерию чувствительности метод ОФ ВЭЖХ оказался более подходящим для никорандила.

Ключевые слова: никорандил, ОФ ВЭЖХ, УФ-спектроскопия.

Модуляторы калиевых каналов – группа химически разнообразных веществ со сходными фармакодинамическими характеристиками, имеющих широкий диапазон клинических эффектов, проявляющихся в первую очередь в бронхолитическом, сосудорасширяющем, кардиопротекторном эффектах [1].

Одним из наиболее перспективных препаратов данной группы является производное амида никотиновой кислоты – никорандил. Наличие активной, мобильной нитрогруппы и остатка амида никотиновой кислоты определяет два механизма его спазмолитического эффекта на основании объединения свойств органических нитратов и модуляторов калиевых каналов. Следствием этого являются периферическая вазодилатация, коронарорасширяющее действие, снижение артериального давления [2, 3].

Для российского фармацевтического рынка данный препарат является относительно новым, поэтому его аналитические характеристики, обеспечивающие качество, разработаны недостаточно. Учитывая вышесказанное, **целью** настоящего исследования явилась разработка аналитических подходов, обеспечивающих качество никорандила в соответствии с международными стандартами.

Для реализации поставленной цели разработан спектр методик анализа, включающих использование спектральных и хроматографических характеристик исследуемого объекта. В качестве объекта анализа взяты таблетки никорандила.

Хроматографические исследования проводили на хроматографическом приборе фирмы «Agilent Technologies 1200 Infinity», с автоматическим пробоотборником *Agilent 1200*, вакуумным микродегазатором, градиентным насосом и термостатом той же серии. Регистрацию полученных данных осуществляли с помощью спектрофотометрического детектора с диодной матрицей серии *Agilent 1200* (диапазон длин волн от 190 до 950 нм, кювета с длиной оптического пути 10 мм; объемом 13 мкл), шаг сканирования – 2 нм.

Для регистрации и обработки спектральных данных и хроматограмм использовали программное обеспечение «*Agilent ChemStation*».

Испытания проводили с использованием стальных хроматографических колонок, наиболее подходящей из которых оказалась: *Reprosil-Pur C18-AQ 150 мм×2 мм*, с размером частиц 3 мкм.

Для приготовления подвижных фаз использовали растворители: воду сверхчистую (HPLC), ацетонитрил (HPLC), ортофосфорную кислоту (х.ч.).

Определение никорандила осуществляли в изократическом режиме элюирования в следующих условиях: подвижная фаза – 4% водный раствор кислоты фосфорной – ацетонитрил (15 : 85), скорость потока 0,25 мл/мин., температура колонки 35°C, давление 168 bar, детекция 261 нм, объем вводимой пробы 5 мкл.

Расчет количественного содержания никорандила проводили по площади полученного пика, которая должна соответствовать площади пика его стандарта по формуле 1.

$$X = \frac{S_x \times C_{cm} \times W_1 \times W_2 \times 100}{S_{cm} \times m \times V_a}$$

[1]



где, S_x – площадь пика исследуемого вещества;

S_{cm} – площадь пика стандарта;

W, W_2 – разведения, мл;

m – масса навески, г;

V_a – объем аликвоты, мл.

Количественное определение препарата проводили методом абсолютной градуировки. Для этого строили градуировочный график зависимости концентрации от площади пика. График представлен на рис. 1.

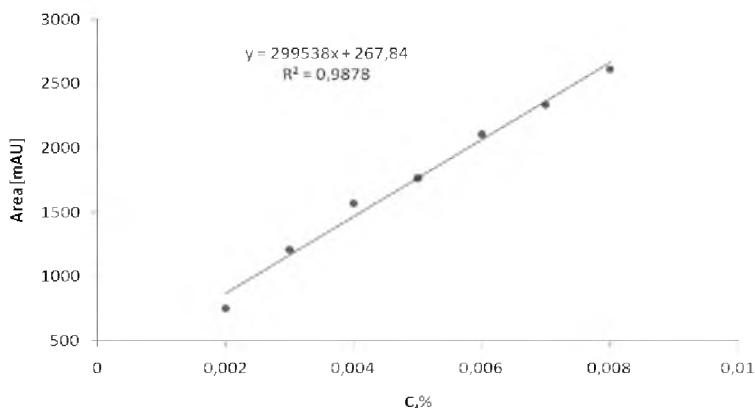


Рис. 1. Градуировочная кривая зависимости площади пика никорандила от концентрации

Как видно из рис. 1 существует прямолинейная зависимость концентрации от площади пика, что свидетельствует о корректности полученных результатов.

Хроматограмма никорандила представлена на рис. 2.

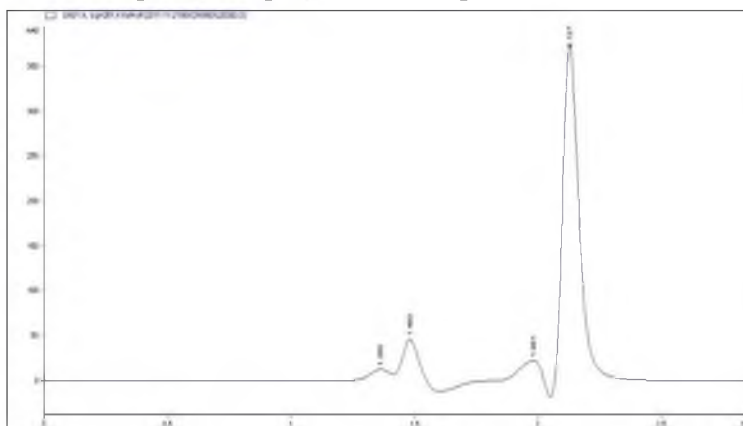


Рис. 2. Спектр поглощения никорандила

УФ-спектр никорандила представлен на рис. 3.

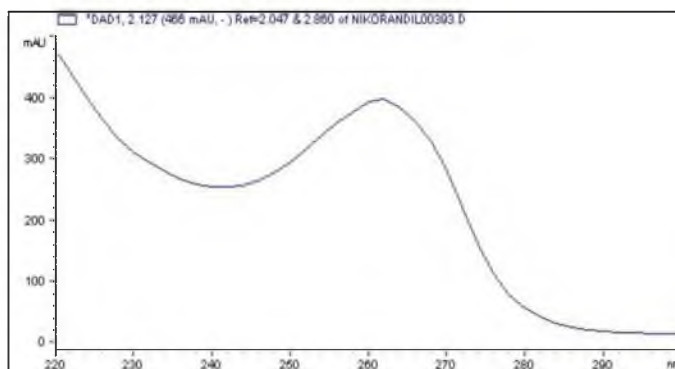


Рис. 3. УФ-спектр поглощения никорандила

Было проведено 7 параллельных измерений. Полученные данные обрабатывали статистически. Результаты исследования количественного определения никорандила в таблетках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии представлены в табл. 1.



Таблица 1

Результаты количественного определения никорандила в таблетках методом ВЭЖХ

№ п/п	Масса навески, г	Содержание никорандила (X), %	S	$\overline{\Delta X}$	ε, %
1	0,0100	100	1,47	3,6	3,5
2	0,0102	102			
3	0,0105	105			
4	0,0098	98			
5	0,0099	99			
6	0,0109	109			
7	0,0100	100			
		$\overline{X} = 101,86 \%$			

Как видно из данных таблицы, содержание никорандила в таблетках составило $101,86 \pm 3,6\%$, ошибка единичного определения с 95,0%-ной вероятностью находилась в пределах 3,5%, что не превышает установленного в ГФ критерия погрешности.

Для сравнения нами также был разработан метод количественного определения никорандила методом УФ-спектрофотометрии по собственному поглощению. Для анализа никорандила методом УФ-спектрофотометрии использовали 0,005%-ный раствор препарата в 0,1 М растворе кислоты хлористоводородной. Для этого около 0,01 г (точная навеска) таблеток никорандила помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 10 мл 0,1 М раствора кислоты хлористоводородной, перемешивали, доводили объём раствора этим же растворителем до метки и перемешивали.

1,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объём 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной до метки и перемешивали.

Спектр поглощения полученного раствора в области от 240 до 340 нм должен иметь максимум поглощения при 261 нм.

Количественное содержание никорандила определяли с использованием стандартного образца (СО) по формуле 2:

$$X = \frac{D_x \times C_{cm} \times W_1 \times W_2}{D_{cm} \times m \times V_a}, \quad [2]$$

где: D_x – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_{cm} – оптическая плотность раствора СО резвератрола;

m_0 – масса навески стандартного образца никорандила, г.

Регистрировали УФ-спектры никорандила в концентрациях от 0,002 до 0,008 . По результатам определения оптической плотности строили калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации (рис. 4).

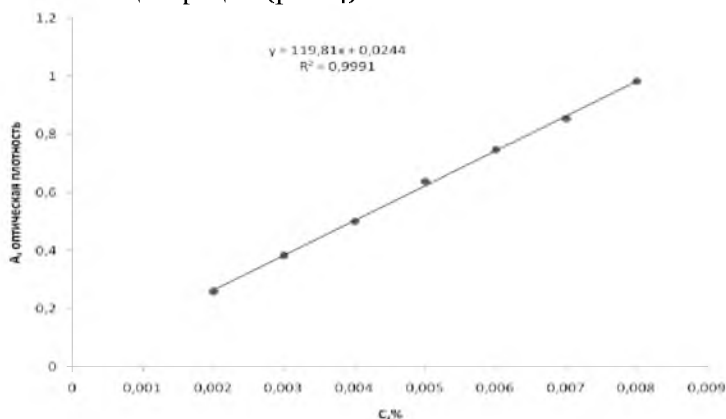


Рис. 4. Градуировочная кривая зависимости оптической плотности никорандила от концентрации

Как видно из рис. 4, существует прямолинейная зависимость концентрации от оптической плотности растворов, что свидетельствует о корректности полученных результатов.



Было проведено 7 параллельных измерений. Результаты статистической обработки определения содержания никорандила в субстанции представлены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты количественного определения никорандила методом УФ-спектрофотометрии

№ п/п	Масса навески, г	Содержание никорандила (X), %	S	$\overline{\Delta X}$	ε , %
1	0,011	110	1,63	3,99	3,9
2	0,010	100			
3	0,0099	99			
4	0,0097	97			
5	0,0101	101			
6	0,0102	102			
7	0,0098	98			
		$\overline{X} = 101\%$			

Как видно из данных табл., содержание никорандила в таблетках составило $101 \pm 3,99\%$, относительная ошибка единичного определения с 95,0%-ной вероятностью находилась в пределах $\pm 3,9\%$, что укладывается в критерий погрешности регламентируемый ГФ.

Сравнительную оценку полученных результатов количественного определения никорандила вышеприведёнными методами проводили по критериям экспрессности, чувствительности и погрешности (воспроизводимости). Полученные результаты приведены в табл. 3.

Таблица 3

Сравнительная оценка методов количественного определения никорандила

Метод анализа	Время выполнения единичного анализа, мин	Чувствительность анализа, мг/мл	Погрешность определения
УФ-спектрофотометрия	2-4	4×10^{-3}	3,05
ОФ ВЭЖХ	3	$1,5 \times 10^{-4}$	3,18

Результаты, приведённые в табл. 3 показывают, что по критерию чувствительности – преимущество имеет метод ВЭЖХ. Критерии экспрессности и погрешности метода УФ-спектрофотометрии сопоставимы с методом ВЭЖХ.

Для установления адекватности методов УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ использовали сравнительный анализ по формуле 3:

$$t_{\text{экс}} = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{\frac{[(n_x - 1) \times S_x^2 + (n_y - 1) \times S_y^2] \times (n_x - n_y)}{(n_x + n_y - 2) \times n_x \times n_y}}} \quad [3]$$

Число степеней свободы f рассчитывали по формуле 4:

$$f = n_x + n_y - 2 \quad [4]$$

Результаты сравнительного анализа УФ-спектрофотометрии с ВЭЖХ приведены в табл. 4.

Таблица 4

Результаты сравнительной оценки методов анализа никорандила

Сравниваемые методы	Экспериментальный t критерий	Табличный t критерий, P, 95%	Число степеней свободы, f
ОФ ВЭЖХ: УФ-спектрофотометрия	1,04	2,23 – 2,13	12

Как видно из приведённых данных табл. 4, экспериментальный t критерий не превышает такого табличного, что свидетельствует о том, что различия между методами анализа незначительны и методы адекватны друг другу.



Литература

1. Hirose, M. Mechanisms of preventive effect of nicorandil on ischaemia-induced ventricular tachyarrhythmia in isolated arterially perfused canine left ventricular wedges / M.Hirose, M. Hirose, N. Tsujino, T. Nakada et al // Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. – 2008. – Vol. 102, №6. – P.504-14.
2. Holzmann S. Cyclic GM Pas possible mediator of coronary arterial relaxation by nicorandil (SG-75) / S. Holzmann // J. Cardiovasc. Pharmacol. – 1983. – Vol. 5, № 3. – P. 364-70.
3. Holzmann S. Pharmacological interaction experiments differentiate between glibenclamide-sensitive K⁺ channels and cyclic GMP as components of vasodilation by nicorandil / S. Holzmann, W.R. Kukovetz, C. Braida et al. // Eur.J. Pharmacol. – 2002. – Vol. 215, №1. – P.1-7.
4. Kukovetz, W.R. Dual mechanism of the relaxing effect of nicorandil by stimulation of cyclic GMP formation and by hyperpolarization / W.R.Kukovetz, S. C. Holzmann, Braida. et al // J. Cardiovasc. Pharmacol. – 2001. – Vol.17, №4. – P.627-33.

COMPARATIVE ANALYSIS OF METHODS FOR QUANTIFYING NICORANDIL

D.I. PISAREV
O.O. NOVIKOV
L.M. DANILENKO

*Belgorod National
Research University*

e-mail:novikov@bsu.edu.ru

This paper deals with the development of analytical approaches, providing an adequate assessment of the quality of nicorandil. For this purpose, the authors used the methods of RP-HPLC and UV spectroscopy that helped develop methods for the qualitative and quantitative determination of nicorandil. Comparative analysis showed the comparability of methods used to assess the quality of nicorandil on criteria of rapidity and reproducibility. By RP-HPLC method sensitivity was more suitable for nicorandil.

Key words: nicorandil, RP-HPLC, UV spectroscopy.