

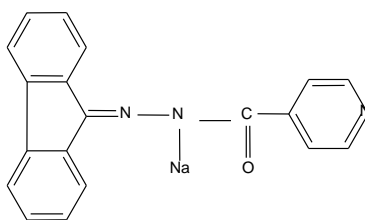
## ВИЗНАЧЕННЯ СПОРІДНЕНИХ ДОМІШОК У СУБСТАНЦІЇ ФЛУРЕНІЗИД-НАТРІЮ

М. М. Коваленко, Л. І. Петрух

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Авторами розроблена методика хроматографічного визначення у тонкому шарі сорбенту споріднених домішок субстанції флуренізид-натрію — нового протимікробного (протитуберкульозного й антихламідійного) фармакологічного засобу. Вибрані й обґрунтовані умови визначення препарату, що дозволяють точно і достовірно контролювати вміст споріднених домішок. Досліджена придатність запропонованої хроматографічної системи. Найоптимальнішою системою розчинників з 14 досліджуваних вибрано суміш *n*-бутанол-етанол-хлороформ (4:1:1). Для аналізу використані стандартні пластинки “Silufol UV-254”.

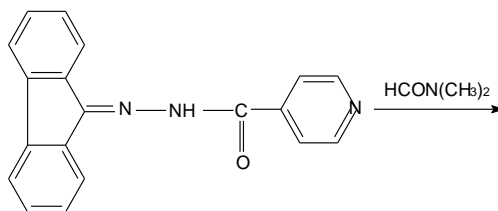
Флуренізид-натрію (I) представляє собою фармакологічний засіб протимікробної дії (виявляє специфічну протитуберкульозну й антихламідійну активність) [1–3].

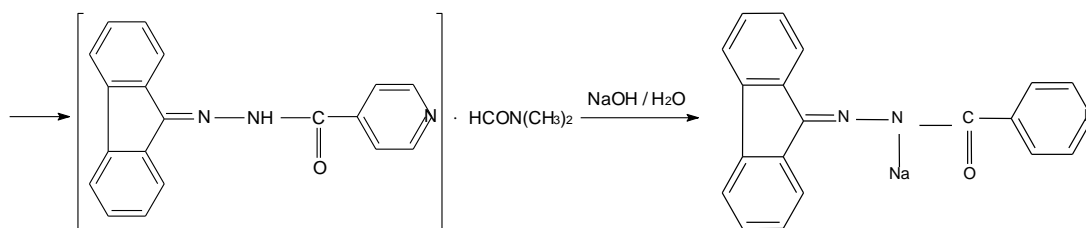


Флуренізид-натрію (I)

Флуренізид-натрію одержують з флуренізиду — лікарського засобу, який впроваджений нами у промислове виробництво на ЗАТ «Київський вітамінний завод» у 2000 рр. і широко застосовується у медичній практиці у різних лікарських формах [4, 5].

Спосіб промислового одержання субстанції флуренізид-натрію (натрійної солі *N*-(9-флуореніліден)-*N*'-ізонікотиногідразиду) включає використання еквімолярних кількостей флуренізиду і кристалічного натрію гідроксиду [6]. Продукт реакції відфільтровують, очищають послідовним промиванням водою (що забезпечує очищення від домішки натрію гідроксиду), а потім спиртом етиловим (відмивання від флуренізиду). Порошок сушать у вакуумі (2.2.32 Спосіб Б ДФ України) над силікагелем безводним Р протягом 24 год. Реакція відбувається за схемою:





Спосіб перетворення флуренізиду у його натрійну сіль (флуренізид-натрію) простий і доступний. Нами оптимізовано умови синтезу і всі стадії технологічного процесу промислового виробництва субстанції флуренізид-натрію з урахуванням міжнародних вимог належної виробничої практики. У ньому використовують стандартизовану вихідну сировину й одержують флуренізид-натрію високого ступеня чистоти [7–11]. Вимоги ДФ України до нових субстанцій включають визначення основних показників якості і методи їх контролю. Існують методи дослідження домішок у субстанції флуренізиду, що описані нами у Технологічному регламенті на виробництво та Пояснювальній записці до ТФС 42-У 5/144-1546-99. Визначені споріднені домішки у субстанції флуренізиду детально описано у нашій роботі [12].

Нами розроблено й описано стандартизований метод поєднаного спектроскопічного та рідинно-хроматографічного контролю якості флуренізиду і флуренізид-натрію [13].

До проекту аналітично-нормативної документації на субстанцію флуренізид-натрію нами опрацьовано розділ «Споріднені домішки».

Мета даної роботи: розробити методики контролю вмісту споріднених домішок у субстанції флуренізиду-натрію.

**Матеріали і методи.** Субстанції флуренізиду та флуренізид-натрію. Для контролю вмісту домішок у фармацевтичних субстанціях, як правило, використовують роздільні методи, такі як тонкошарова (ТШХ), газо-рідинна і рідинна хроматографія.

Нами досліджено можливість розподілу флуренізиду і флуренізид-натрію за допомогою тонкошарової хроматографії як найбільш економного і легкого у виконанні методу. Для хроматографування використані пластинки “Silufol UV-254, розміром 15x15 см. Їх якість гарантована фірмою “Kawalier” Чеської Республіки. Плями на хроматограмі детектували в УФ-світлі при довжині хвилі 254 нм або в парах йоду.

Для цього були апробовані різні системи розчинників, подані у табл. 1.

Таблиця 1

Досліджені системи розчинників

№ п/п	Системи розчинників	Співвідношення розчинників
1	Хлороформ–метанол	5 : 2
2	Етилацетат–бензол	1 : 5
3	Етилацетат–бензол–метанол	1 : 4 : 2
4	Хлороформ–ацетон–діетиламін	25 : 15 : 1
5	Хлороформ–етилацетат–бензол	3 : 2 : 3
6	Хлороформ–ефір–етанол	3 : 3 : 2
7	Хлороформ–ефір–метанол	3 : 3 : 2
8	Хлороформ–етилацетат–бензол–вода	4 : 2 : 1 : 1
9	Хлороформ–етилацетат–бензол–вода	5 : 3 : 1 : 2
10	Тетрахлорметан–етилацетат–ацетон	6 : 2 : 1
11	Тетрахлорметан–етилацетат–ацетон	4 : 2 : 3
12	н.Бутанол–етанол	4 : 1
13	н.Бутанол–етанол–хлороформ	4 : 1 : 3
14	н.Бутанол–етанол–хлороформ	4 : 1 : 1
15	Етанол- хлороформ–гліцерин–вода	5 : 5 : 3 : 3

**Результати й обговорення.** У системах розчинників 1–13 розподіл речовин не чіткий. Для розділення флуоренізиду та флуоренізид-натрію у субстанції нами запропоновано системи розчинників 14 і 15: н.бутанол-етанол-хлороформ (4:1:1) і етанол-хлороформ-гліцерин-вода (5:5:3:3). Оптимальною виявилась система розчинників н.бутанол-етанол-хлороформ (4:1:1) (табл. 2).

Таблиця 2

**Значення Rf для флуоренізид-натрію і флуоренізиду  
(у суміші розчинників н.бутанол-етанол-хлороформ (4:1:1))**

Препарати	Колір плями в УФ-світлі	Значення Rf
Флуоренізид-натрію	Жовто-гарячий	0,67
Флуоренізид	Жовтий	0,73

Чутливість реакцій на визначення домішок, виявляли у заданих умовах досліду з урахуванням прийнятих величин, а саме: мінімуму відкриття досліджуваної речовини і мінімальної (граничної) концентрації.

Під час стандартизації хроматографічного аналізу субстанції флуоренізид-натрію велике значення надавали:

1. Підготовці проб (взяття наважок; їх розчинення; приготування розведень; нанесення проби за допомогою мікрошприца на хроматографічну пластинку; приготування системи розчинників; насичення камери тощо).

2. Оцінці хроматограм за розділювальною здатністю (селективністю) і за формою отриманих плям.

Досліджено різні концентрації (від 1 до 0,001 %) флуоренізид-натрію і вихідного продукту синтезу — флуоренізиду.

Встановлено, що концентрації проб від 0,05 до 0,001 % рухаються з однаковою швидкістю під час піднімання системи розчинників н.бутанол-етанол-хлороформ (4:1:1); їх плями у всі моменти руху зберігають симетричну форму, що свідчить про ефективність хроматографічної системи.

При вищих концентраціях (1,0–0,1%) на пластинках відзначені хвостаті плями з витягнутим заднім фронтом для всіх досліджуваних речовин. На хроматографічній пластинці плями згаданих речовин (для найбільш розведеного розчину) чітко проглядаються в УФ-світлі або після проявлення в парах йоду. Інтервали і чутливість виявлення плям на хроматограмах є достатніми для даної хроматографічної системи.

Для забезпечення достовірності вибраних умов хроматографування необхідно контролювати роздільну здатність і чутливість системи. У зв'язку з цим до методики введено тест «Придатність хроматографічної системи», в якому запропоновано хроматографувати розчин флуоренізиду та флуоренізид-натрію у кількостях, що регламентується.

Результати аналізу вважаються достовірними, якщо виконуються вимоги тесту «Придатність хроматографічної системи».

*Приготування розчину стандартного зразка флуоренізиду:* 0,25 г (точна наважка) флуоренізиду (стандартний зразок атестований Фармакопейним комітетом України) вміщують у мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють у 80 мл етанолу, доводять об'єм розчину цим же розчинником до мітки і перемішують (розчин А). 1 мл розчину А вміщують у мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм розчину етанолом до мітки і перемішують.

Розчин використовують свіжоприготовленим.

Хроматограма досліджуваних розчинів подана на рисунку.

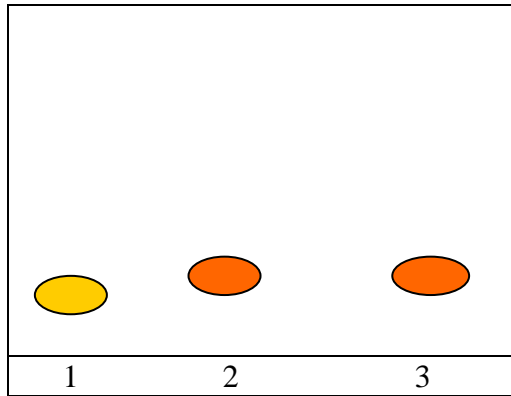


Рис. Хроматограма в умовах тесту “Споріднені домішки”

1. Досліджуваний розчин препарату. 2. Розчин СЗРС флуренізиду. 3. Перевірка придатності системи.

*Приготування розчину для перевірки придатності хроматографічної системи.* У мірну колбу місткістю 50 мл вміщують 1 мл розчину А стандартного зразка флуренізиду, доводять об'єм розчину досліджуваним розчином до мітки і перемішують.

Розчин використовують свіжоприготовленим.

Підтвердженням придатності системи є наявність на хроматограмі розчину чітко видимих і поділених плям.

$R_f$  основної плями на хроматограмі досліджуваного розчину — 0,67.

Нами встановлено, що спорідненими домішками у досліджуваній субстанції флуренізид-натрію може бути тільки вихідний продукт синтезу — флуренізид, який за якістю відповідає ТФС 42У-5/144-1546-99 з процентним умістом основної речовини не менше 98,5 і не більше 100,5 %.

## ВИСНОВКИ

Вибрані й обґрунтовані умови визначення, які дозволяють із точністю, що вимагається, і достовірністю контролювати вміст споріднених домішок у субстанції флуренізид-натрію.

**Перспективи подальших досліджень.** На підставі проведених досліджень до розділу «Споріднені домішки» проекту аналітично-нормативної документації на субстанцію флуренізид-натрію пропонується включити таку методику:

*Приготування досліджуваного розчину.*

Близько 0,50 г (точна наважка) препарату вміщують у мірну колбу місткістю 100 мл, додають 80 мл етанолу, розчиняють на водяній бані протягом 3 хв, доводять об'єм розчину цим же розчинником до мітки і перемішують.

*Визначення.* На лінію старту хроматографічної пластинки "Silufol UV-254" розміром 15x15 см, наносять 10 мкл (50 мкг флуренізид-натрію) досліджуваного розчину, 10 мкл (0,25 мкг флуренізиду) розчину стандартного зразка речовини-свідка (СЗРС) флуренізиду і 10 мкл (50 мкг флуренізид-натрію, 0,25 мкг флуренізиду) розчину стандартного зразка для перевірки придатності хроматографічної системи. Пластинку висушують на повітрі протягом 5 хв, потім вміщують у камеру з сумішшю розчинників н.бутанол-етанол-хлороформ (4:1:1) і хроматографують висхідним способом. Коли фронт розчинників пройде 10 см від лінії старту, пластинку виймають з камери, висушують на повітрі протягом 5-10 хв і проглядають в УФ-світлі при довжині хвилі 254 нм.

На хроматограмі досліджуваного розчину, крім основної плями, допускається наявність додаткової плями, розміщеної на рівні плями на хроматограмі розчину СЗРС флуренізиду, що не перевищує її за величиною та інтенсивністю забарвлення (не

більше 0,5 %). Результати аналізу вважаються достовірними, якщо виконуються вимоги тесту "Придатність хроматографічної системи".

Хроматографічна система вважається придатною, якщо на хроматограмі розчину для перевірки придатності хроматографічної системи чітко видно одну пляму.

## DEFINITION OF RELATED IMPURITIES IN SUBSTANCE FLURENIZYD-NATRIUM

*M. M. Kovalenko, L. I. Petrukh*

Lviv National Medical University named after Danylo Halytsky

### S U M M A R Y

The method of chromatography determination of in thin layer of sorbent related impurities in the substance flurenizyd-natrium — of new antimicrobial (antituberculous and antichlamydious) pharmacologic agents. Selected and reasonable conditions of definition that accurately and reliably control their content in the substance. A study on the suitability of chromatographic systems. Most optimal solvent system proved to be a mixture of n-butanol-ethanol-chloroform (4:1:1). For the analysis we use the standard plates "Silufol UV-254".

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ РОДСТВЕННЫХ ПРИМЕСЕЙ В СУБСТАНЦИИ ФЛУРЕНИЗИД-НАТРИЯ

*М. М. Коваленко, Л. И. Петрух*

Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого

### А Н Н О Т А Ц И Я

Авторами разработана методика хроматографического определения в тонком слое сорбента родственных примесей в субстанции флуренизид-натрия — нового противомикробного (противотуберкулезного и антихламидийного) фармакологического средства. Выбраны и обоснованы условия определения препарата, позволяющие точно и достоверно контролировать содержание родственных примесей. Исследована пригодность предложенной хроматографической системы. Оптимальной системой растворителей из 14 исследованных, выбрано смесь н-бутанол-этанол-хлороформ (4:1:1). Для анализа использованы стандартные пластинки "Silufol UV-254".

### Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Пат. 23806 А, Україна, МКВ С 07 С 109/04, А 61 К 31/15. Натрійна сіль флуореніліденгідразида, яка виявляє протимікробну дію / Л. І. Петрух, О. А. Ткач, Н. О. Виноград та ін. // заявл. 14.02.97; опубл. 16. 06. 1998. — Бюл. № 4, 1998.

2. *Петрух Л. І.* Флуорени як туберкулостатики. Флуренізид: мікробіологічні, фармакологічні та клінічні аспекти / За ред. В. М. Петрух, М. М. Коваленко, О. І. Михалик — Львів, 2008. — 462 с.

3. *Петрух Л. І.* Актуальність створення і впровадження у промислове виробництво нових лікарських засобів (збірник описів винаходів) / За ред. Л. І. Петрух, В. М. Петрух — Львів, ЛьвЦНТЕІ, 2003. — 196 с.

4. *Петрух Л. І., Коваленко М. М., Михалик О. І.* Флуренізид — новий оригінальний препарат для лікування туберкульозу / Фармаком. — № 2. — 1999. — С. 9–13.

5. *Петрух Л. І.* Флуорени як туберкулостатики. Флуренізмід: мікробіологічні, фармакологічні та клінічні аспекти/ Монографія. — Львів, 2008. — 463 с.
6. Пат. 77124, Україна, МПК С 07 С 35/00, С07С243/00. Спосіб промислового одержання субстанції флуренізмід-натрію / Петрух Л.І., Коваленко М.М. //заявл. 23.05.2005; опубл. 16.10. 2006 . — Бюл. № 10, 2006.
7. *Коваленко М. М.* Оптимізація технології виробництва флуренізмиду-натрію/“Фармацевтичний часопис” — Наук.-практ. журнал. — 2007. — № 4. — С. 13–14.
8. *Коваленко М. М.* Вивчення фізико-хімічних властивостей флуренізмід-натрію. VI Національний з’їзд фармацевтів України. — Харків, 28-30 вересня 2005. — С. 163.
9. *Коваленко М. М., Михалик О. І.* Підходи до стандартизації показників якості флуренізмід-натрію/ Мат.13 Наук. конф. “Львівські хімічні читання — 2011” — С. 69.
10. *Коваленко М. М., Михалик О. І.* Розроблення документації на нову субстанцію флуренізмід-натрію/ Мат. 4-ї наук.-практ. конф. з міжн. участю “Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів” — Тернопіль, 29-30 вересня 2011. — С. 109–110.
11. *Коваленко М. М., Репій Н. О., Гельо В. Г.* УФ-спектрофотометричне дослідження флуренізмід-натрію. / VI Національний з’їзд фармацевтів України. — Харків, 28-30 вересня 2005. — С. 165.
12. *Коваленко М. М., Петрух Л. І., Хованська Н. П.* Визначення споріднених домішок у субстанції флуренізмиду / Фармаком. — 1999. — № 6. — С. 35–39.
13. *Петрух Л. І., Коваленко М. М., Ткаченко В. І.* Розробка стандартизованих методів поєднаного спектроскопічного та рідинно-хроматографічного контролю якості флуренізмиду і флуренізмід-натрію / Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок. — Львів, 2005. — Вип.6, № 3, 4— С. 293–297.