

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИЙ МЕТОД КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ВАРФАРИНУ НАТРІЮ КЛАТРАТУ В СУБСТАНЦІІ ТА ТАБЛЕТКАХ

Ключові слова: варфарин, кількісне визначення, УФ-спектрофотометрія, таблетки

Варфарину натрію клатрат ((RS)-4-гідрокси-3-(3-оксо-1-фенілбутил)-2Н-хромен-2-он) широко застосовують як терапевтичний засіб для інгібування коагуляції крові (група непрямих антикоагулянтів). Він блокує синтез вітамін К-залежних факторів згортання крові. Його дія носить кумулятивний характер, тому токсичність звичайно є наслідком регулярного застосування [1, 2, 6].

Досліджуваний лікарський засіб застосовують у вигляді таблеток із вмістом у них діючої речовини варфарину натрію клатрату відповідно по 2,5 або 3 мг.

Метою дослідження було вивчення можливості кількісного визначення варфарину натрію клатрату у субстанції і таблетках методом ультрафіолетової спектрофотометрії.

Матеріали та методи дослідження

Використовувані розчинники та реактиви мали кваліфікацію «х. ч.». Стандартний зразок варфарину натрію клатрату було надано фірмою-виробником «Cadilla Healthcare LTD» (Індія).

Дослідження таблеток варфарину здійснювали на матеріалі, отриманому від українського виробника – ТОВ «Фармастарт», м. Київ.

Вивчали УФ-спектри варфарину натрію клатрату та таблеток варфарину за допомогою спектрофотометра SPECORD 200-222 U 214.

Абсорбцію досліджуваних розчинів вимірювали у кварцових кюветах з шаром завтовшки 10 мм. УФ-спектри варфарину натрію клатрату вивчали в межах від 200 до 400 нм, оскільки аналізована речовина виявляє вибіркоче світлобिरання у зазначених межах, а концентрація досліджуваних розчинів у всіх випадках становила 1 мг/%. Графік електронних спектрів аналізованої речовини будували у координатах $A = f(\lambda)$.

Як розчинники використовували воду очищену, 95%-й етанол, метанол, 0,1 М розчин кислоти хлоридної, 1 М розчин кислоти хлоридної, 0,1 М розчин кислоти сульфатної, 1 М розчин кислоти сульфатної, 0,1 М розчин натрію гідроксиду, 1 М розчин натрію гідроксиду, ацетонітрил, хлороформ, циклогексан. Вибір зазначених розчинників було зумовлено такими факторами: а) частим використанням деяких розчинників (етанол, метанол, ацетонітрил, циклогексан, хлороформ) для виділення субстанції з лікарських форм та з біоматеріалу; б) необхідністю підбору розчинників, які утворюють розчин з найбільш високим значенням абсорбції з метою використання для кількісного визначення; в) можливістю встановлення утворення солей в розчинах хлоридної, сульфатної кислот та розчинах натрію гідроксиду, а також виявлення гідролітичних процесів у кислих та лужних середовищах.

Методики контролю якості (МКЯ) відносно варфарину натрію клатрату, що діють на території України, рекомендують для кількісного визначення аналізованого

препарату у субстанції високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ) з використанням колонки Zorbax CN (L_{10}), детектування здійснюють за 260 нм, та метод УФ-спектрофотометрії за 308 нм у середовищі 0,01 М розчину натрію гідроксиду, розраховують концентрацію препарату із використанням питомого показника вбирання, а не стандартного зразка. Для кількісного визначення варфарину натрію клатрату у таблетках по 3 мг застосовують метод ВЕРХ із використанням колонки Symmetry C8, детектування здійснюють за 280 нм.

Метод сенсibiliзуючої флуоресценції використовували Т. Д. Смирнова та співавт. для кількісного визначення варфарину у біологічному середовищі [4]. Розроблено методики електрофоретичного розділення сумішей лікарських засобів з наступним визначенням варфарину за допомогою кварцового або модифікованого капіляру. При цьому як модифікатор фонового електроліту використовували діоксан-лігнін [3].

Н. А. Ткачова та співавт. розробили методики визначення варфарину у зразках плазми крові та біологічних рідинах за допомогою метода мас-спектрометрії [5].

У разі судово-хімічних досліджень варфарин кількісно визначали у біологічних об'єктах методом газової хроматографії із полум'яно-іонізаційним детектуванням [10, 12], мас-спектрометричним методом [11, 13]. Техніка рідинної хроматографії дає змогу визначати варфарин у присутності його метаболітів [7–9, 14–17].

Результати дослідження та обговорення

Під час визначення розчинника, придатного для розроблення методики УФ-спектрофотометричного кількісного визначення варфарину в субстанції та лікарських формах (таблетках), до уваги брали ступінь його розчинності, можливість використання обраного розчинника для виділення аналізованої сполуки з біологічного матеріалу у разі судово-хімічних досліджень.

На підставі вищезазначених факторів як розчинники під час розроблення МКЯ для субстанції було використано воду, 95%-й етанол та ацетонітрил, а для таблеток – 95%-й етанол та ацетонітрил.

Попередньо було визначено межі концентрації, за яких світловбирання розчинів варфарину у воді, 95%-му етанолі та ацетонітрилі підпорядковувалося загальному закону Бугера–Ламберта–Бера. З цією метою брали факторні наважки субстанції від 10 до 50 мг, розчиняли в обраних розчинниках у мірних колбах ємністю 100 мл і шляхом подальшого розведення одержували серію розчинів певної концентрації. Для кожної концентрації абсорбцію розчину вимірювали в шести паралельних дослідках із наступним розрахунком середнього значення питомого показника вбирання ($A_{1\%}^{1\text{см}}$) для визначення оптимальної факторної наважки під час здійснення аналізу. Експериментально встановлено, що УФ-спектр варфарину у зазначених розчинниках характеризується двома смугами вбирання.

Перша смуга мала коливальну структуру із високоінтенсивними максимумами за 204 та 207 нм (вода), 203, 204, 205, 207 та 212 нм (95%-й етанол), 202, 206, 208, 210, 214, 219 та 222 нм (ацетонітрил). Друга смуга вбирання варфарину характеризувалася в обраних для кількісного визначення розчинниках одним максимумом у середньохвильовій частині спектру, а саме, у воді за 306 нм, у 95%-му етанолі за 312 нм та в ацетонітрилі за 319 нм.

З метою виключення помилки під час вимірювання абсорбції аналізованих розчинів варфарину, що може бути пов'язано з калібруванням спектрофотометра, температурним фактором тощо, ДФУ вимагає виконувати аналіз лікарських засобів із використанням стандартних зразків аналізованої речовини. У нашому випадку

варфарин-стандарт отримували від фірми-виробника «Cadilla Healthcare LTD» (Індія).

Вміст препарату при цьому визначали за формулою (1):

$$C_1 = \frac{A_1 \cdot C_0}{A_0} , \quad (1)$$

де C_1 – концентрація випробуваного розчину;

C_0 – концентрація розчину стандартного зразка;

A_1 – абсорбція випробуваного розчину;

A_0 – абсорбція розчину стандартного зразка.

Попередньо розраховували питомі показники вбирання варфарину у воді ($940,00 \pm 0,04$); 95%-му етанолі ($960,00 \pm 0,05$) та в ацетонітрилі ($800,00 \pm 0,03$) та визначали граничні концентрації, в межах яких абсорбція підпорядкувалася закону Бугера–Ламберта–Бера, відповідно $0,15\text{--}1,4$ мг %, $0,15\text{--}1,3$ мг % та $0,2\text{--}1,5$ мг %.

Кількісне визначення варфарину натрію клатрату в субстанції

Факторну наважку варфарину ($0,010$ г для води та 95%-го етанолу) та $0,011$ г для ацетонітрилу переносили до мірної колби ємністю 100 мл, додавали 70 мл обраного розчинника та перемішували до повного розчинення субстанції. Використовуваним розчинником доводили до мітки і знову ретельно перемішували (розчин А); 5 мл розчину А за допомогою піпетки переносили до мірної колби ємністю 100 мл; водою або 95%-м етанолом, або ацетонітрилом доводили до мітки і ретельно перемішували (розчин Б).

Абсорбцію одержанного розчину вимірювали за допомогою спектрофотометра за 306 нм (вода), 311 нм (95%-й етанол) та 319 нм (ацетонітрил) у кюветі з шаром завтовшки 10 мм. Як розчин порівняння використовували воду, або 95%-й етанол, або ацетонітрил.

Паралельно за тих самих довжин хвиль вимірювали абсорбцію розчину стандартного зразка варфарину в концентрації $0,0010$ г в 100 мл (вода та 95%-й етанол), $0,0011$ г в 100 мл (ацетонітрил).

Вміст варфарину розраховували за формулою (2):

$$C = \frac{A_1 \cdot m_1 \cdot 100}{A_0 \cdot m_0} , \quad (2)$$

де A_1 – абсорбція випробуваного розчину за 306 нм (вода), 311 нм (95%-й етанол) або 319 нм (ацетонітрил);

A_0 – абсорбція розчину стандартного зразка варфарину в концентрації $0,0010$ г в 100 мл для води та 95%-го етанолу, в концентрації $0,0011$ г в 100 мл для ацетонітрилу;

m_1 – маса наважки субстанції, г;

m_0 – маса наважки стандартного зразка варфарину, г.

Вміст варфарину в субстанції в перерахунку на суху речовину має бути в межах від 98% до 102%.

Виготовлення розчинів стандартного зразка варфарину

Точну наважку стандартного зразка варфарину $0,010$ г для води та 95%-го етанолу або $0,011$ г для ацетонітрилу вміщували до мірної колби ємністю 100 мл, розчиняли за ретельного перемішування у 70 мл використуваного розчинника, доводили об'єм розчину водою, або 95%-м етанолом, або ацетонітрилом до мітки і перемішували; 5 мл одержаного розчину вміщували у мірну колбу ємністю 100 мл, доводили об'єм розчину обраним розчинником до мітки і перемішували.

Розчин стандартного зразка варфарину у разі визначення діючої речовини

у таблетках готували аналогічно наведеній методиці, яку застосовують під час кількісного визначення варфарину у субстанції.

Результати кількісного визначення варфарину натрію клатрату в субстанції наведено в табл. 1.

Т а б л и ц я 1

Результати кількісного визначення варфарину натрію клатрату в субстанції за стандартним зразком ($n=6$)

Розчинник	Довжина хвилі, нм	Наважка варфарину, мг/%	Знайдено		Метрологічні характеристики
			мг/%	%	
Вода	306	0,98	0,99	101,09	$\bar{x}=100,19$ $S^2=1,7557$ $S=1,3250$ $\Delta\bar{x}=1,3253$ $\varepsilon=1,3227$
		1,01	1,03	101,98	
		0,99	1,00	101,01	
		1,02	1,01	99,02	
		1,10	1,09	99,09	
		0,97	0,96	98,96	
95%-й етанол	312	1,02	1,03	100,98	$\bar{x}=99,49$ $S^2=1,4724$ $S=1,2134$ $\Delta\bar{x}=1,2137$ $\varepsilon=1,2199$
		1,00	0,99	99,00	
		0,98	0,97	98,97	
		1,02	1,01	99,02	
		1,00	0,98	98,00	
		1,03	1,04	100,97	
Ацетонітрил	319	1,12	1,13	100,89	$\bar{x}=99,70$ $S^2=1,9129$ $S=1,3831$ $\Delta\bar{x}=1,3834$ $\varepsilon=1,3876$
		1,08	1,07	99,07	
		1,06	1,07	100,94	
		1,10	1,08	98,18	
		1,09	1,07	98,17	
		1,05	1,06	100,95	

Кількісне визначення варфарину у таблетках

Відповідно до нормативно-аналітичної документації вміст варфарину у кожній таблетці становить 3,0 мг.

Експериментально встановлено, що допоміжні речовини, які входять до складу таблеток, не мають вибіркового світлопоглинання в межах від 200 до 400 нм і тому не заважають кількісному визначенню варфарину в таблетках.

Для дослідження було виготовлено штучну суміш таблеток варфарину. Як розчинники у разі розроблення методики кількісного визначення варфарину у таблетках рекомендують 95%-й етанол та ацетонітрил.

Методика визначення

Точну наважку таблеткової маси (близько 25 мг для етанолу та 27 мг для ацетонітрилу) кількісно переносять у мірну колбу об'ємом 100 мл, додають 70 мл використуваного розчинника, енергійно збовтували протягом 20 хв, доводили до мітки одним із зазначених розчинників, ретельно перемішували і фільтрували через паперовий фільтр (синя стрічка), 10–15 мл перших порцій фільтрату відкидали. Абсорбцію наступних порцій фільтрату вимірюють за 312 нм (95%-й етанол) або при 319 нм (ацетонітрил).

Вміст варфарину в одній таблетці (C_1) обчислювали за формулою (3):

$$C_1 = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 5 \cdot b \cdot P}{A_0 \cdot m_1 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 5 \cdot 100} = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot b \cdot P}{A_0 \cdot m_1 \cdot 100}, \quad (3)$$

де A_1 – абсорбція густини випробуваного розчину;

A_0 – абсорбція густини розчину стандартного зразка;

m_1 – маса наважки таблеткової маси;

m_0 – маса наважки стандартного зразка варфарину;

b – середня маса однієї таблетки;

P – вміст основної речовини в стандартному зразку варфарину, %.

Вміст варфарину в одній таблетці має бути від 2,7 мг до 3,3 мг в розрахунку на середню масу таблетки. Результати кількісного визначення варфарину в таблетках наведено в табл. 2.

Т а б л и ц я 2

Результати кількісного визначення варфарину в таблетках

Довжина хвилі, нм	Розчинники	Наважка аналізованої маси таблетки, мг	Вміст препарату у випробуваному розчині, мг/100 мл	Знайдено		Метрологічні характеристики
				мг/100 мл	%	
312	95%-й етанол	24,5	0,48	0,49	102,08	$\bar{x}=99,33$ $S^2=4,2915$ $S=2,0716$ $\Delta\bar{x}=2,0720$ $\varepsilon=2,0860$
		26,2	0,52	0,53	101,92	
		25,2	0,50	0,49	98,00	
		24,8	0,49	0,48	97,96	
		25,4	0,51	0,50	98,04	
		24,8	0,49	0,48	97,96	
319	Ацетонітрил	26,7	0,54	0,55	101,85	$\bar{x}=100,64$ $S^2=4,8057$ $S=2,1922$ $\Delta\bar{x}=2,1926$ $\varepsilon=2,1787$
		26,9	0,55	0,57	103,64	
		26,5	0,53	0,54	101,88	
		27,2	0,56	0,55	98,21	
		27,4	0,57	0,56	98,25	
		27,2	0,56	0,56	100,00	

Кожна таблетка з варфарином має вмішувати не менш ніж 90% і не більш ніж 110% (від 2,7 до 3,3 мг) заявленої кількості варфарину.

В и с н о в к и

1. Вивчено УФ-спектри варфарину у воді очищеній, 95%-му етанолі, метанолі, 0,1 М розчині кислоти хлоридної, 1 М розчині кислоти хлоридної, 0,1 М розчині кислоти сульфатної, 1 М розчині кислоти сульфатної, 0,1 М розчині натрію гідроксиду, 1 М розчині натрію гідроксиду, ацетонітрилі, хлороформі, циклогексані. Встановлено, що УФ-спектри варфарину у зазначених розчинниках характеризуються двома смугами вбирання. Перша смуга має максимуми у межах від 201 до 241 нм, друга – в межах 305–319 нм.

2. Розроблено та запропоновано методику кількісного визначення варфарину натрію клатрату в субстанції (вода за 306 нм, 95%-й етанол – 312 нм, ацетонітрил – 319 нм) та в таблетках (95%-й етанол за 312 нм, ацетонітрил – 319 нм).

3. Похибка визначення варфарину натрію клатрату в субстанції не перевищує $\pm 1,3876$, а в таблетках – $\pm 2,1787$, що свідчить про достовірність одержаних результатів та запропонованої методики.

ЛІТЕРАТУРА

1. Компендиум 2010 – лекарственные препараты / Под ред. *В. Н. Коваленко, А. П. Викторова*. – К.: МОРИОН, 2010. – 2240 с.
2. *Машковский М. Д.* Лекарственные средства. – М.: Новая волна, 2010. – 1216 с.
3. *Прохорова А. Ф.* Макроциклические модификаторы для повышения селективности электрофоретического разделения энантиомеров органических кислот. Автореф. дис. ... канд. хим. наук. Спец. 02.00.02 – «Орг. химия». – М., 2010. – 22 с.
4. *Смирнова Т. Д., Неврюева Н. В., Штыков С. М. и др.* Определение варфарина методом сенсibilизированной флуоресценции с применением организованных сред // Журн. аналит. химии. – 2009. – Т. 64, № 11. – С. 1114–1119.
5. *Ткачева Н. А.* Исследование влияния генотипа *Vkorc 1c1173T* на фармакокинетические параметры метаболизма варфарина // Рус. мед. журн. – 2005. – № 1. – С. 15–17.
6. *Фланеган Р. Дж.* Основы аналитической токсикологии. – Женева: ВООЗ, 1999. – 363 с.
7. *Fasco M. J., Cashin M. J., Kaminsky L. S.* / A novel method for the quantization of warfarin and its metabolites in plasma // J. Liq. Chrom. – 1979. – V. 2. – P. 565–575.
8. *Guan F., Ishii A., Seno H. et al.* A method for simultaneous determination of five anticoagulant rodenticides in whole blood by high-performance liquid chromatography // J. Pharm. Biomed. Anal. – 1999. – V. 21. – P. 179–185.
9. *Kollroser M., Schober C.* Determination of coumarin-type anticoagulants in human plasma by HPLC-electrospray ionization tandem mass-spectrometry with an ion trap detector // Clin. Chem. – 2002. – V. 48. – P. 84–91.
10. *Loomis C. W.* Determination of warfarin in plasma by gas-liquid chromatography // Anal. Chem. Acta. – 1979. – V. 106. – P. 155–159.
11. *Maurer H. H.* Detection of 4-hydroxycoumarin anticoagulants and their metabolites in urine as part of a systematic toxicological analysis procedure for acidic drugs and poisons by gas chromatography-mass spectrometry after extractive methylation // J. Chrom. B. – 1998. – V. 714. – P. 181–195.
12. *Midha F. K. K., Gilvera I. J. Mc., Coope J. K.* GLC determination of plasma levels of warfarin // J. Pharm. Sci. – 1974. – V. 63. – P. 1725–1729.
13. *Odam E. M., Townsend M. G.* The determination of warfarin in animal tissues by electron-capture gas liquid chromatography // Analyst. – 1976. – V. 101. – P. 478–484.
14. *Osman A., Arbiing K., Lindahl T. L.* A new high-performance liquid chromatography method for determination of warfarin enantiomers // J. Chrom. B. – 2005. – V. 826. – P. 75–80.
15. *Tasrer R. A. R., Nakatsn K.* Rapid, reliable and sensitive assay for warfarin using normal-phase high-performance liquid chromatography // J. Chrom. – 1982. – V. 228. – P. 346–349.
16. *Ufer M., Kammerer B., Kirchheiner I. et al.* Determination of phenprocoumon, warfarin and their monohydroxylated metabolites in human plasma and urine by liquid chromatography-mass spectrometry after solid-phase extraction // J. Chrom. B. – 2004. – V. 809. – P. 217–226.
17. *Uno T., Niioka T., Hayakari M. et al.* Simultaneous determination of warfarin enantiomers and its metabolite in human plasma by column-switching high-performance liquid chromatography with chiral separation // Ther. Drug Mon. – 2007. – V. 29. – P. 333–339.

Надійшла до редакції 29. 04. 2013.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВАРФАРИНА НАТРИЯ КЛАТРАТА В СУБСТАНЦИИ И ТАБЛЕТКАХ

Ключевые слова: варфарин, количественное определение, УФ-спектрофотометрия, субстанция, таблетки

А Н Н О Т А Ц И Я

Варфарина натрия клатрат широко применяют в терапевтической практике как непрямой антикоагулянт. Его действие носит кумулятивный характер, поэтому его токсичность обуславливается регулярным применением.

Цель исследования – изучение возможности количественного определения варфарина натрия клатрата в субстанции и таблетках методом ультрафиолетовой спектрофотометрии.

Изучали УФ-спектры варфарина натрия клатрата в воде, 95%-м этаноле, метаноле, 0,1 М растворе кислоты хлоридной, 1 М растворе кислоты хлоридной, 0,1 М растворе кислоты сульфатной, 1 М растворе кислоты сульфатной, 0, 1 М растворе натрия гидроксида, 1 М растворе натрия гидроксида, ацетонитриле, хлороформе и циклогексане.

УФ-спектры варфарина в указанных растворителях характеризуются двумя полосами поглощения. Первая полоса находится в пределах 201–241 нм, вторая – 305–314 нм.

Разработаны и предложены методики количественного определения варфарина в субстанции (вода при 306 нм, 95%-й этанол – 312 нм, ацетонитрил – 219 нм) и в таблетках (95%-й этанол при 312 нм, ацетонитрил – 219 нм).

Ошибка определения варфарина натрия клатрата в субстанции не превышает $\pm 1,3876$, а в таблетках – $\pm 2,1787$, что подтверждает достоверность полученных результатов и предложенной методики.

SPECTROPHOTOMETRIC METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF WARFARIN CLATHRATE SODIUM IN SUBSTANCE AND TABLETS

Key words: warfarin, quantitative determination, UV-spectrometric method, substance, tablets

A B S T R A C T

Warfarin sodium clathrate is widely used as a therapeutic agent for inhibiting blood coagulation (group of indirect anticoagulants), preventing the synthesis of vitamin K-dependent factors. Its effect is cumulative, so toxicity is usually the result of regular use.

We have studied drug used in tablet form to the content of the active substance warfarin sodium clathrates under 2.5 or 3 mg.

The aim of the study was to investigate the possibility of quantitative determination of warfarin sodium clathrates in substance and tablets by ultraviolet spectrophotometry.

We studied the UV spectra of clathrate warfarin sodium tablets and warfarin with a spectrophotometer SPECORD 200-222 U 214.

As the solvent is used: purified water, 95% ethanol, methanol, 0.1 M solution of hydrochloric acid, 1 M solution of hydrochloric acid, 0.1 M solution of sulfuric acid, 1 M solution of sulfuric acid, 0.1 M sodium hydroxide; 1 M solution of sodium hydroxide, acetonitrile, chloroform, cyclohexane. The choice of these solvents is caused by following factors: a) the frequent use of certain solvents (ethanol, methanol, acetonitrile, cyclohexane, chloroform) to highlight the substance of dosage forms and biomaterial b) the necessity of selection of solvents that form a solution with the highest absorption value for use to quantify c) a possibility of formation of salts in solutions of hydrochloric, sulfuric acid and sodium hydroxide, and detection of hydrolytic processes in acidic and alkaline environments.

The UV spectra of warfarin is studied in purified water, 95% ethanol, methanol, 0.1 M solution of hydrochloric acid, 1 M solution of hydrochloric acid, 0.1 M solution of sulfuric acid, 1 M solution of sulfuric acid, 0.1 M sodium hydroxide, 1 M sodium hydroxide, acetonitrile, chloroform, cyclohexane. It is found that the UV spectra of warfarin in these solvents are characterized by two absorption bands. The first band has a maximum in the range of 201 to 241 nm, the second - in the range 305-319 nm.

A method is proposed to quantify substance warfarin sodium clathrates (water at 306 nm, 95% ethanol at 312 nm in acetonitrile at 319 nm) and tablets (95% ethanol at 312 nm, acetonitrile).

The error of determination of warfarin sodium clathrates in the substance does not exceed ± 1.3876 , and tablets ± 2.1787 , showing the reliability of the results.

Електронна адреса для листування з автором: dextr2004@gmail.com