

2. Meshcheryakova S.A., Kataev V.A., Fattakhova I.Ya. [et al.] Synthesis and antibacterial activity of acetanilides and acetylhydrazones of thietanypyrimidine-2,4(1H,3H)dione series. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2015, Vol. 49, №9, P. 28-31. (In Russ)
3. Fattakhova I. Ya., Meshcheryakova S.A., Kataev V.A. Synthesis of new N-phenylacetamide derivatives of thietanypyrimidine-2,4-(1H,3H)-dione. *Bashkir chemical journal*, 2014, Vol. 21, №3, P. 33-36. (In Russ)
4. Mironov A.N., Bunatjan N.D. et al. *Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennyh sredstv* (Guidelines for pre-clinical trials of drugs). Vol. 1. Moscow, Grif i K, 2012, 944 p. (In Russ)
5. Meshcheryakova S.A., Kataev V.A. Synthesis of new thietanypyrimidine and thietanylimidazole derivatives. *Russian journal of Organic Chemistry*, 2013, Vol. 49, №9, P. 1358-1360. (In Russ)

УДК 615.214.22: 543.544.5

© С.К. Ордабаева, К.К. Атырханова, А.О. Сопбекова, 2018

С.К. Ордабаева, К.К. Атырханова, А.О. Сопбекова  
**УНИФИЦИРОВАННАЯ МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
 ПИРАЦЕТАМА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМАХ МЕТОДОМ  
 ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**  
*Южно-Казахстанская медицинская академия, г. Шымкент*

В настоящее время в медицине широко применяется субстанция пирacetам и его лекарственные формы. Но унифицированной методики количественного определения пирacetам в субстанции и лекарственных формах на сегодняшний день нет.

Целью исследования явилась разработка унифицированной методики количественного определения пирacetам в субстанции и лекарственных формах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Учитывая свойства исследуемого препарата, неподвижной фазы и элюента, для количественного определения пирacetам в субстанции и лекарственных формах экспериментально подобрана подвижная фаза из метанола и воды (2:8). Валидирование результатов исследования показало специфичность, высокую воспроизводимость и точность разработанной методики при относительной ошибке  $\pm 1,53\%$  для капсул пирacetам и  $\pm 0,98\%$  для инъекционного раствора пирacetам.

Таким образом, разработана достоверная унифицированная методика количественного определения пирacetам в лекарственных формах методом ВЭЖХ.

**Ключевые слова:** пирacetам, субстанция, лекарственная форма, высокоэффективная жидкостная хроматография, унифицирование, валидация.

S.K. Ordabayeva, K.K. Atyrkhanova, A.O. Sopbekova  
**THE UNIFIED METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF PYRACETAM  
 IN MEDICINAL FORMS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY**

Currently pyracetam substance and its medicinal forms are widely used in medicine. But there is no unified method of quantitative determination of pyracetam in the substance and medicinal forms.

The aim of the research is to develop the unified method of quantitative determination of pyracetam in substance and dosage forms by high performance liquid chromatography (HPLC).

Taking into account the properties of the studied preparation, the stationary phase and the eluent, a mobile phase from methanol and water (2:8) was experimentally selected for the quantitative determination of pyracetam in the substance and dosage forms. Validation of the results of the study showed specificity, high reproducibility and accuracy of the developed procedure with a relative error of  $\pm 1.53\%$  for capsules of pyracetam and  $\pm 0.98\%$  for the injectable solution of pyracetam.

Thus, a reliable unified procedure for the quantitative determination of pyracetam in dosage forms by the HPLC method was developed.

**Kew words:** pyracetam, drug substance, dosage form, high performance liquid chromatography, unification, validation.

Негативное влияние экологического и психоэмоционального стрессов на большинство населения нашей планеты, особенно жителей больших городов, является актуальной проблемой современного общества. Доказано, что стресс не безвреден для организма человека, он является фактором риска многих сердечно-сосудистых заболеваний, а также оказывает негативное воздействие на нервную систему, в результате чего человек становится раздражительным, у него снижается работоспособность, ухудшается память и процессы мышления. В связи с этим ученые непрерывно занимаются поиском путей профилактики и коррекции отрицательного воздействия стресса на нервную систему.

Более 50 лет назад возникла концепция ноотропных средств, был синтезирован и испытан лекарственный препарат Пирacetам. Это дало мощный толчок к поиску и созданию иных веществ с подобным принципом действия, эти исследования продолжаются и по сей день [1-6].

В медицине широко применяется субстанция пирacetам и его лекарственные формы (пирacetам раствор для инъекции 20% 5 мл; капсулы пирacetам 0,4 г; таблетки луцетам (пирacetам) 400 мг).

На сегодняшний день отсутствует единая, унифицированная методика количественного определения пирacetам в субстанции и лекарственных формах.

В нормативных документах для количественного анализа пираретама и его лекарственных форм рекомендуются метод Кьельдаля, методы безводной нейтрализации, гравиметрии, жидкостной хроматографии [7-12].

Вышеназванные методы имеют некоторые недостатки. Например, метод Кьельдаля очень трудоемкий, для выполнения которого затрачивается 3-4 часа времени. К тому же метод многостадийный, поэтому при выполнении могут быть потери, что сказывается на результатах анализа. Для проведения безводной нейтрализации нужен опытный аналитик. Кроме этого, в этом методе используются ядовитые, летучие вещества, такие как ледяная уксусная и хлорная кислоты, для работы необходимо специальное оборудование. Учитывая недостатки этих методов, разработка доступных, эффективных и экономически выгодных унифицированных методик для исследования данной группы препаратов является актуальной задачей.

Унификация аналитических методик приводит к совершенствованию и упрощению методов стандартизации лекарственных препаратов, формируется единый подход к анализу лекарств, уменьшается время анализа и количество используемых реактивов. Таким образом, унифицированные методики анализа способствуют повышению эффективности и качества лекарств.

Наиболее воспроизводимым и селективным, позволяющим определить количественное содержание активного компонента в лекарственных формах пираретама является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Цель исследования – разработка унифицированной методики количественного определения пираретама в субстанции и лекарственных формах методом ВЭЖХ.

#### **Материал и методы**

В работе были использованы: субстанция пираретама (ФС-150430042, КНР); пираретам, капсулы 0,4 г (АНД РК 42-6002-13); пираретам, раствор для инъекций 20% 5 мл (АНД РК 42-6007-13). Вспомогательные вещества: кальция стеарат (ГФ РК т. 2, с. 243), магния карбонат основной (ГФ РК т. 2, с. 296). Реактивы и растворители: натрия ацетат тригидрат (ГФ РК т. 2, с. 336), кислота уксусная разведенная (ГФ РК т.1, с. 422), вода для инъекций (ГФ РК т. 2, с. 469), метанол («Merck», Германия). Реактивы и растворители квалификации «ч.д.а».

Хроматографические условия. Исследования проводились на жидкостном хромато-

графе Shimadzu LC Prominence (Япония); насос LC 20AD; дегазатор DGU-20A5г; термостат СТО 20А; УФ-детектор SPD-20А, измерения проводились при длине волны 210 нм; в работе использовалась колонка, заполненная обращенно-фазным сорбентом Eurospher 100-5 C18, 250×4,6 mm. Скорость подачи элюента: 1мл/мин; температура колонки: 25°C; объем инъекции образца: 20 мкл.

Приготовление раствора рабочего стандартного образца (PCO) пираретама. Около 50 мг (точная навеска) PCO субстанции пираретама помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляют 20 мл подвижной фазы, встряхивают до растворения, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор А).

3,0 мл полученного раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора подвижной фазой до метки, перемешивают и фильтруют (раствор Б). Раствор используют свежеприготовленным.

Методика анализа капсулы пираретама 0,4 г. Около 25 мг (точная навеска) содержимого капсул переносят в мерную колбу емкостью 25 мл, добавляют 15 мл подвижной фазы и перемешивают до растворения образца. Раствор доводят до метки подвижной фазой, тщательно перемешивают и фильтруют через нейлоновый фильтр (А).

3,0 мл раствора А отбирают в мерную колбу емкостью 100 мл и доводят подвижной фазой до метки, тщательно перемешивают (Б).

Полученный исследуемый раствор (Б) и раствор PCO пираретама хроматографируют в указанных выше условиях и получают не менее 5 хроматограмм.

Методика анализа пираретама, раствора для инъекций 20% 5 мл. Около 1 мл (точная навеска) инъекционного раствора пираретама переносят в мерную колбу емкостью 200 мл, доводят подвижной фазой до метки и тщательно перемешивают (А).

3,0 мл раствора А отбирают в мерную колбу емкостью 100 мл и доводят подвижной фазой до метки, тщательно перемешивают (Б).

Полученный исследуемый раствор (Б) и раствор PCO пираретама хроматографируют в указанных выше условиях, получая не менее 5 хроматограмм.

Анализ модельной смеси (пираретам, капсулы 0,4 г) и раствора плацебо проводят аналогично капсулированному препарату. Конечная концентрация раствора составляет 30 мкг/мл.

Анализ модельной смеси (пираретам, раствор для инъекций 20% 5 мл) и раствора

плацебо проводят аналогично инъекционному препарату. Конечная концентрация раствора составляет 30 мкг/мл.

Валидацию разработанной методики определения парацетама проводили на основании ОФС ГФ РК «Валидация аналитических методик и испытаний», руководства по валидации биоаналитических методик Food and Drug Administration (FDA), а также «Руководства по экспертизе лекарственных средств» European Medicines Agency (EMA) [13,14].

Метрологические характеристики рассчитывали при анализе образцов субстанции парацетама и его лекарственных форм (капсулы, инъекционные растворы) для уровня вероятности  $p=0,95$  по следующим критериям: точность, воспроизводимость, специфичность, линейность, правильность и прецизионность.

### Результаты и обсуждение

Структурные свойства молекулы анализируемого вещества определяют характеристику ее удерживания на стационарной фазе. Анализируемое вещество с большой гидрофобной

частью (С-Н, С-С и неполярные атомные связи) удерживается дольше, потому что оно не взаимодействует с водной поверхностью. С другой стороны, анализируемые вещества с большими полярными частями в своей структуре (имеющие полярные группы – -ОН, -NH<sub>2</sub>, -СОО или NH<sub>3</sub>) удерживаются меньше, так как они лучше связываются с водой.

Вышеназванные свойства анализируемого вещества учитывались при подборе подвижной фазы (элюента). В результате исследования влияния элюента различного состава на селективность методики нами для количественного определения парацетама в субстанции и лекарственных формах экспериментально подобрана подвижная фаза, состоящая из метанола и воды в соотношениях 2:8 (по объему).

При скорости потока подвижной фазы 1 мл/мин время удерживания (tR) стандартного раствора парацетама составило  $3,02 \pm 0,01$  мин. На рис. 1 представлена хроматограмма субстанции парацетама при выбранных условиях проведения хроматографического анализа.

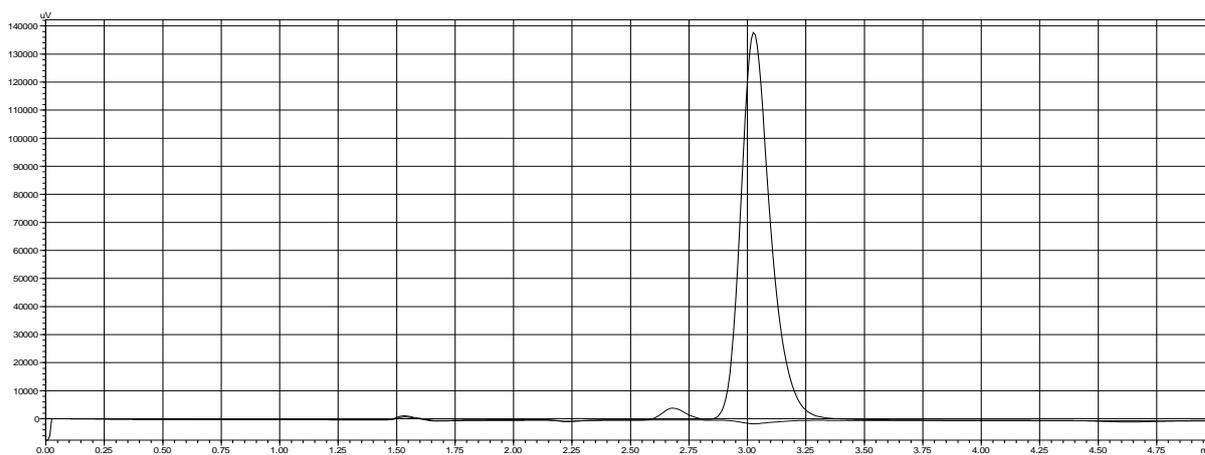


Рис. 1. Хроматограмма раствора РСО парацетама (C=30 мкг/мл)

Специфичность разработанной методики подтверждалась совпадением времени удерживания хроматографических пиков парацетама в субстанции и ее лекарственных формах ( $3,02 \pm 0,01$  мин). Для определения специфичности проводили анализ 5 образцов стандартного раствора парацетама в диапазоне концентраций 15–45 мкг/мл. На хроматограммах стандартных образцов посторонних пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания парацетама, не наблюдалось.

Линейность методики оценивалась по графику зависимости хроматографической площади от концентраций парацетама в пробе: 10, 20, 30, 40, 50 мкг/мл. При статистической обработке линейной зависимости по уравнению  $y=bx+a$  коэффициент корреляции линейного регрессионного графика  $r$  для пи-

рацетама составляет 0,9998. На основании полученных результатов можно утверждать о соблюдении линейности (рис. 2, табл. 1).

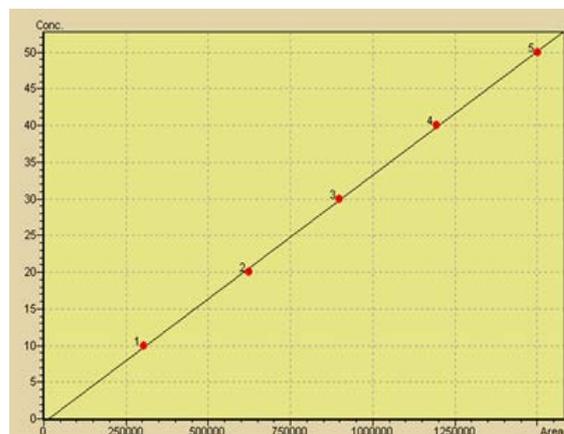


Рис. 2. Калибровочный график зависимости площадей хроматографических пиков от концентрации парацетама

Оценка линейной зависимости площадей хроматографических пиков от концентрации пирецетама		
Исследуемое вещество С, мкг/мл	Площадь хроматографического пика	Метрологические характеристики (ГФ РК, т. 1, с. 100)
10.000	304832	SD= 6,052±0,007 RSD=1,832 ε <sub>ср.</sub> % = 1,78 r = 0,9998
20.000	622969	
30.000	897478	
40.000	1193290	
50.000	1500531	

**Правильность и прецизионность.** Проводили анализ 3-х образцов с прибавлением стандартного раствора пирецетама до получения концентраций: 15 мкг/мл, 30 мкг/мл, 45 мкг/мл. Каждый раствор хроматографировали 6 раз. Исследование проводили в течение 1-го

(intra-day) и 2-го дней (inter-day). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины стандартного отклонения (SD), относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ε, %), приведенные в табл. 2 и 3.

Таблица 2

Правильность и прецизионность методики (intra-day). Последовательность № 1

Введено вещества, мкг/мл	S(h) хр. пика	Найдено вещества, мкг/мл		SD, (n=6)	RSD, % (n=6)	ε, %
		(n=6)	Z			
15	455619	15,23	15,05	0,1778	1,1813	1,24
	454423	15,19				
	447542	14,96				
	444251	14,85				
	444849	14,87				
	455021	15,21				
30	860083	30,75	30,72	0,5071	0,5320	1,73
	927693	31,01				
	935471	31,27				
	904956	30,25				
	866963	29,98				
	929787	31,08				
45	134591	44,99	45,46	0,5692	1,2520	1,32
	136057	45,48				
	135519	45,30				
	133903	44,76				
	137643	46,01				
	138331	46,24				

Таблица 3

Правильность и прецизионность методики (inter-day). Последовательность № 2

Введено, мкг/мл	S(h) хр. пика	Найдено, мкг/мл		SD, (n=6)	RSD, % (n=6)	ε, %
		(n=6)	Z			
15	445747	14,90	14,94	0,2540	1,7004	1,78
	458611	15,33				
	441858	14,77				
	443354	14,82				
	457115	14,68				
	459508	15,18				
30	877135	29,32	29,42	0,2217	0,5698	1,94
	874442	29,23				
	928291	30,03				
	901367	30,13				
	865168	28,92				
	863672	28,87				
45	133963	44,78	45,42	0,6527	1,4370	1,51
	134113	44,83				
	136925	45,77				
	134352	44,91				
	138182	46,19				
	137762	46,05				

Как видно из табл. 2 и 3, относительное стандартное отклонение анализа составляет соответственно для последовательности № 1 от 1,1813 до 1,6697%, а для последовательности № 2 от 1,4370 до 1,8397% и не превышает допустимого стандартного отклонения, что под-

тверждает прецизионность и правильность разработанной методики.

Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относительной погрешности (правильность), находящихся в пределах 1,24-1,73% для после

довательности 1 и 1,51-1,94% для последовательности 2, соответствуют нормам (не более 2,00%).

**Стабильность.** Исследована стабильность стандартных растворов пираретама на уровнях концентраций 15-45 мкг/мл, приготовленных для хроматографического анализа. Кратковременная стабильность была исследована для приготовленных проб в течение 24 ч при анализе на следующий день. Долговременная стабильность изучена при хроматографировании исследуемых растворов в течение 14 дней при температуре 2 – 8 °С. Площадь хроматографического пика при повторных анализах не менялась более чем на 10%.

При проведении многократных индивидуальных определений концентраций анализируемого препарата и его лекарственных форм наблюдалось достоверное совпадение результатов, что характеризует воспроизводимость аналитической методики. При этом относительная ошибка среднего результата по капсулам пираретама составляет  $\pm 1,53\%$ , по раствору пираретама для инъекций  $\pm 0,98\%$ , что позволяет рекомендовать разработанную унифицированную методику для количественного анализа препарата в лекарственных формах (табл. 4).

Таблица 4

Найденное количество пираретама	Метрологические характеристики (ГФ РК т.1, с.100)						
	n	хср	S	Δхср	Rf	Хср±Δхср	еср.,%
В капсулах, мг: 360.8, 370.9, 370.9, 400.9, 390.8, 420.9, 410.9, 430.8, 380.8	9	400,07	1,85	0,61	2,36	27,83±0,06	1,53
В инъекционном растворе, мг/мл: 190.8, 210.0, 200.8, 200.9, 200.7, 200.8, 200.7, 200.1, 200.8	9	200,62	0,40	1,96	2,36	30,80±0,08	0,98

Были также проанализированы растворы плацебо лекарственных форм. Вспомогательные вещества, входящие в состав капсул и инъекционного раствора, не имеют хроматографических пиков в условиях хроматографирования.

Таким образом, валидирование результатов исследования показало специфичность,

высокую воспроизводимость и точность разработанной методики ВЭЖХ.

#### Выводы

Разработана достоверная унифицированная методика количественного определения пираретама в лекарственных формах методом ВЭЖХ.

#### Сведения об авторах статьи:

**Ордабаева Сауле Кутымовна** – д.фарм.наук, профессор, заведующая кафедрой фармацевтической и токсикологической химии Южно-Казахстанской медицинской академии. Адрес: Казахстан, 160021, г. Шымкент, площадь Аль-Фараби, 1. Email: ordabaeva@mail.ru.

**Атырханова Карлыгаш Касымхановна** – магистрант кафедры фармацевтической и токсикологической химии Южно-Казахстанской медицинской академии. Адрес: Казахстан, 160021, г. Шымкент, площадь Аль-Фараби, 1. Email: aisha\_20072015@mail.ru.

**Сопбекова Анаркуль Онлабековна** – к.фарм.наук, и.о.профессора кафедры фармацевтической и токсикологической химии Южно-Казахстанской медицинской академии. Адрес: Казахстан, 160021, г. Шымкент, площадь Аль-Фараби, 1. Email: anarkulsopbekova-@mail.ru.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Flicker, L. Piracetam for dementia or cognitive impairment / Flicker, L; Grimley Evans, G. // The Cochrane database of systematic reviews. – 2001 (2): CD001011. doi:10.1002/14651858.CD001011. PMID 11405971
- Müller, WE. Piracetam: novelty in a unique mode of action / Müller, WE; Eckert, GP; Eckert, A // Pharmacopsychiatry. – 2014. – Vol. 32 Suppl 1. – P. 2–9. doi:10.1055/s-2007-979230. PMID 10338102
- Nootropil // NetDoctor.co.uk. 8 July 2004. Retrieved 21 September 2009.
- Nootropil® // Arzneimittel-Kompendium der Schweiz. 2013-09-12. Retrieved 2013-10-27.
- Piracetam [online]. Available from URL: <http://www.piracetam.com>
- Tacconi, MT. Piracetam: physiological disposition and mechanism of action / Tacconi, MT; Wurtman, RJ // Advances in neurology. – 2012. – Vol. 43: 675–85. PMID 3946121
- Государственная фармакопея Республики Казахстан. – Алматы: Издательский дом «Жибек жолы». – 2008. – Т. 1. – 592 с.
- Государственная фармакопея Республики Казахстан. – Алматы: Издательский дом «Жибек жолы». – 2009. – Т. 2. – С.423-424.
- The European Pharmacopoeia, 7.0, Vol. 1, Strasbourg: Council Of Europe: EDQM. – 2008. – P.2697-2698.
- The British Pharmacopoeia (BP 2016). – London The Stationery Office. – 2016. – P. 4776-4783.
- АНД РК 42-6002-13. – Пираретам, капсулы 0,4 г. – ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов», Республика Беларусь. – 2013. – 9 с.
- АНД РК 42-6007-13 Пираретам, раствор для инъекций 20% 5 мл – ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов», Республика Беларусь. – 2013 г. –13 с.
- Аладышева Ж.И. Практические аспекты работ по валидации аналитических методик / Ж.И. Аладышева, В.В. Беляев, В.В. Беляев, В.В. Береговых // Фармация. – 2008. – № 7. – С. 9-14.
- Государственная фармакопея Республики Казахстан. – Алматы: Издательский дом «Жибек жолы». – 2008. – Т. 1. – 592 с.
- Эпштейн, Н.А. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе // Химико-фармацевтический журнал. – 2004. – Т. 1, № 4. – С.40-55.
- Эпштейн, Н.А. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе (обзор) / Н.А. Эпштейн // Химико-фармацевтический журнал. – 2004. – Т. 2, № 9. – С.82-86.

---

**REFERENCES**

1. Flicker, L; Grimley Evans, G (2001). Piracetam for dementia or cognitive impairment. The Cochrane database of systematic reviews (2): CD001011. doi:10.1002/14651858.CD001011. PMID 11405971 (in English)
2. Müller, WE; Eckert, GP; Eckert, A (2014). Piracetam: novelty in a unique mode of action. *Pharmacopsychiatry*. 32 Suppl 1: 2–9. doi:10.1055/s-2007-979230. PMID 10338102(in English)
3. Nootropil. NetDoctor.co.uk. 8 July 2004. Retrieved 21 September 2009. (in English)
4. Nootropil. *Arzneimittel-Kompendium der Schweiz*. 2013-09-12. Retrieved 2013-10-27. (in German)
5. Piracetam [online]. Available from URL: <http://www.piracetam.com> (in English)
6. Tacconi, MT; Wurtman, RJ (2012). Piracetam: physiological disposition and mechanism of action. *Advances in neurology*. 43: 675–85. PMID 3946121
7. Gosudarstvennaya farmakopeya Respubliki Kazakhstan (State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan). Almaty, Izdatel'skij dom «Zhibek zholy», 2008, vol. 1, 592 s.
8. Gosudarstvennaya farmakopeya Respubliki Kazakhstan (State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan). Almaty, Izdatel'skij dom «Zhibek zholy», 2008, vol. 2, p. 423-424.
9. The European Pharmacopoeia, 7.0, Vol. 1, Strasbourg: Council Of Europe: EDQM, 2008, P.2697-2698.
10. The British Pharmacopoeia (BP 2016). London The Stationery Office, 2016, P. 4776-4783.
11. AND RK 42-6002-13. – Piratsetam, kapsuly 0,4 g. OAO «Borisovskij zavod meditskikh preparatov», Respublika Belarus', 2013, 9 p.
12. AND RK 42-6007-13 Piratsetam, rastvor dlya in'ektsij 20% 5 ml .OAO «Borisovskij zavod meditskikh preparatov», Respublika Belarus'. 2013, 13 s.
13. Aladysheva Zh.I., Belyaev V.V., Beregovykh V.V. Practical aspects of operations to validate analytical procedures. *Pharmacy*, 2008, № 7, p. 9-14.
14. Epstein, N. Ah. Assessment of suitability (validation) of HPLC techniques in pharmaceutical analysis. *Chemical-pharmaceutical journal*, 2004, Vol. 1, № 4, p. 40-55.