

GORAN NIKOLIĆ¹
IVANA SAVIĆ¹
VLADIMIR BANKOVIĆ²

¹Tehnološki fakultet,
Leskovac, Srbija

²FHI Zdravlje-Actavis,
Leskovac, Srbija

STRUČNI RAD

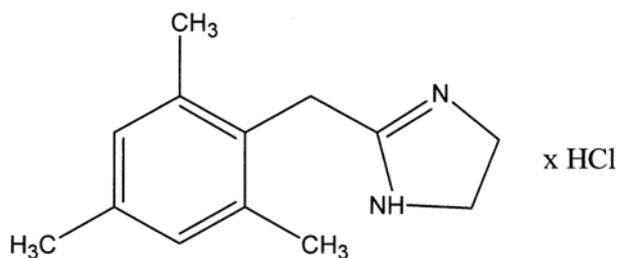
549.464:615.225:543.4 + 543.544

SISTEMSKA ANALIZA ADRENERGIČKOG VAZOKONSTRIKTORA TRIMAZOLIN HIDROHLORIDA

U radu je sistemskom analizom ispitivan trimazolin hidrohlorid, koji se primenjuje kao farmaceutski aktivna komponenta (adrenergički vazokonstriktor) za izradu dekongestivnih preparata. U domaćim i inostranim farmakopejama, kao i u naučnoj i patentnoj literaturi, o trimazolinu i meto-dama njegovog ispitivanja nema podataka. Sistemskom analizom obuhvaćene su dve faze ispitivanja. Prethodnim ispitivanjem izvršena je kompletna fizičko-hemijska karakterizacija sintetizovane supstance. U drugoj fazi, upotrebom apsorpcionih spektroskopskih metoda (FTIR, UV-VIS, ¹H-NMR), sa određenim stepenom sigurnosti, potvrđena je hemijska struktura sintetizovane farmakološki aktivne supstance. Korišćene spektroskopske metode pokazale su se uspešne u identifikaciji i ispitivanju čistoće trimazolin hidrohlorida. Za kvalitativnu analizu trimazolin hidrohlorida u nazalnim preparatima korišćena je tečna (RP-HPLC) hromatografija. U radu je, u cilju kvantitativnog određivanja trimazolin hidrohlorida kod dekongestivnih preparata, razvijana metoda titrimetrijske analize.

Za kontrolu simptoma alergijskog rinitisa najčešće se koriste antihistaminici, koji nisu od velike koristi za terapiju ove bolesti. U ovom slučaju, veliku primenu našla su dekongestivna sredstva, tj. adrenergički vazokonstriktori. Oni izazivaju konstrikciju malih krvnih sudova i smanjuju sekreciju u nosu, stimulišući alfa-adrenergičke receptore, uz istovremenu inhibiciju parasimpatičkih vlakana [1]. Deluju delimično i kao antagonisti histamina u mikrocirkulaciji. Dekongestivna sredstva mogu biti tečne, polučvrste i čvrste konzistencije. Primenuju se peroralno ili lokalno u vidu aerosola ili kapi. Kao nazalni preparati, aplikuju se u nosnu šupljinu, sa ciljem postizanja lokalnog ili sistemskog dejstva. Vodeni nazalni preparati su najčešće izotonični i sadrže pomoćne materije kojima se reguliše viskozitet i pH preparata, povećava solubilizacija aktivnih supstanci, stabilise sam preparat, kao i pogodne konzervanse kada preparat nema adekvatna antimikrobna svojstva [2].

U praktičnoj primeni, danas je komercijalno prisutan veći broj nazalnih preparata, koji kao adrenergičke vazokonstriktore najčešće sadrže efedrin i fenilefrin [3]. Kao farmaceutski aktivne supstance zastupljene su same ili u kombinaciji sa drugim supstancama sličnog dejstva, radi povećanja efikasnosti preparata. Istraživanja na ovom polju omogućila su primenu srodnih jedinjenja sličnog farmakološkog dejstva. Jedan od takvih primera je uvođenje trimazolin hidrohlorida kao adrenergičkog vazokonstriktora.



Slika 1. Strukturalna formula trimazolin hidrohlorida
Figure 1. Structural formula of trimazolin hydrochloride

ra. Strukturalna formula trimazolin hidrohlorida prikazana je na slici 1 [4].

Dekongestivni preparat novijeg datuma, Adrianol kapi (Zdravlje-Actavis, Leskovac, Srbija), kao adrenergičke vazokonstriktore sadrži fenilefrin hidrohlorid i trimazolin hidrohlorid. Upotrebom trimazolin hidrohlorida povećana je efikasnost ovom preparatu. Od pomoćnih materija prisutni su: dinatrijum-hidrogenfosfat, dihidrat, metilceluloza M.H.B. 10000, glicerol, fenil-živa(II)-borat, amonijum hidroksid, 96% etanol i prečišćena voda. Adrianol (1,5 mg cm⁻³ trimazolin hidrohlorida i 1 mg cm⁻³ fenilefrin hidrohlorida) namenjen je za odrasle osobe, dok Adrianol-T (0,5 mg cm⁻³ trimazolin hidrohlorida i 0,5 mg·cm⁻³ fenilefrin hidrohlorida) koriste deca starija od dve godine.

Poznato je da svaka farmaceutska supstanca i njen preparat, pre nego što izađu na tržište, moraju zadovoljiti sve zahteve i uputstva koja propisuje najviši državni organ, kao što je Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije, neka druga inostrana nadležna organizacija sa evropskog prostora ili Svetska zdravstvena organizacija [5]. Preparat mora da odgovara nameni, što podrazumeva da ima odgovarajući terapijski efekat, da je odgovarajućeg sadržaja, stabilan u

Adresa autora: G.S. Nikolić, Tehnološki fakultet, Bulevar oslobođenja 124, 16000 Leskovac, Srbija

E-mail: goranchem_yu@yahoo.com

Rad primljen: Januar 29, 2008.

Rad prihvaćen: Mart 6, 2008.

predviđenom roku upotrebe, u ispravnom pakovanju i tačno označen. Iz tog razloga svaka farmaceutska supstanca i njen preparat moraju biti podvrgnuti strogoj kontroli kvaliteta. Ukoliko preparat sadrži aktivnu supstancu koja je navedena u farmakopeji, ona mora da odgovara zahtevima relevantne monografije u toku celog perioda roka trajanja. Uputstva i zahtevi prikazani u monografijama moraju obavezno biti ispunjeni, izuzev ako nije drugačije naglašeno [5].

Međutim, Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije donela je 2005. godine Spisak regulatornih mera iz bezbednosnih razloga za pojedine lekove na našem tržištu. U delu bezbedonosnih mera navodi i preparat Adrianol. Kao razlog neželjenih reakcija i procene bezbednosnog profila leka naglašava nedostatak bilo kakvih podataka o trimazolinu, odnosno efikasnosti i bezbednosti ovih kombinovanih kapi za nos (posebno, kod dece mlađe od 2 godine). Procena bezbednosnog profila leka je u proceduri obnove, ali i dalje nedostaju fizičko-hemijski podaci ispitivanja trimazolina [6].

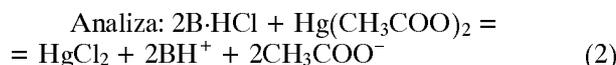
Jugoslovenska i druge inostrane farmakopeje (Evropska, Britanska, Američka) u svojim monografijama sadrže i opisuju samo fenilefrin. O trimazolinu i metodama njegovog ispitivanja nema nikakvih podataka, kako u farmakopejama, tako i u naučnoj literaturi. U patentnoj literaturi postoje podaci samo o postupku sinteze trimazolina i trimazolin hidrohlorida, bez fizičko-hemijske karakterizacije [7]. Imajući u vidu ovu činjenicu, kao i da farmakobiološki učinak preparata zavisi od fizičko-hemijskih svojstava aktivnih komponenti, cilj ovog rada je sistemska analiza sintetizovanog trimazolina koji se primenjuje kao farmaceutski aktivna komponenta za izradu Adrianola.

Sistemska analiza opisana u ovom radu obuhvata dve faze. Prva faza je prethodno ispitivanje, koje ukazuje u kom pravcu treba usmeriti kvalitativnu analizu. Prethodno ispitivanje obuhvata fizičko-hemijsku karakterizaciju: utvrđivanje porekla supstance, primena elementarne analize, ispitivanje spoljašnjih osobina supstance, izgled i oblik kristala, boja i miris, specifična težina, higroskopnost, temperatura topljenja, rastvorljivost, pH vrednost rastvora, indeks refrakcije, viskozitet, provodljivost, bistrina i stepen opalescencije tečnosti i stepen obojenosti tečnosti. Druga faza sistemske analize je strukturna identifikacija aktivne supstance. Cilj identifikacije supstance je potvrda hemijske strukture i sastava proizvoda, kako bi se određenim stepenom sigurnosti potvrdilo da uzorak odgovara deklarisanom opisu. U ovom slučaju, korišćene su apsorpcione spektroskopske metode (ultravioletna spektrofotometrija (UV), infracrvena spektroskopija (IR), nuklearna magnetna rezonanca (NMR)). UV metoda se upotrebljava za identifikovanje hromofora, primenom IR tehnika mogu se identifikovati sve funkcionalne grupe ispitivane supstance, dok NMR dopunjuje potvrdu struk-

ture ispitivane supstance. Takođe, UV i IR pored metode tačne hromatografije (HPLC) predstavljaju i veoma korisne metode za ispitivanje čistoće supstance i identifikovanje prisustva aktivne supstance u preparatu.

Imajući u vidu da je trimazolin slaba organska baza (B), a trimazolin hidrohlorid njena so (B·HCl), za kvantitativnu analizu odabrana je metoda titrimetrijske analize u nevodenoj sredini. Poznato je da se kod titracije slabe baze najčešće koristi amfiprotinski rastvarač koji ima nivelirajući ili diferencijalni efekat za slabe baze, pa je u ovom slučaju odabrana glacialna (bezvodna) sirćetna kiselina (CH₃COOH). Titracija se obično izvodi rastvorom neke kiseline u sirćetnoj kiselini. Kao titrant za slabe baze najčešće se koristi perhlorna kiselina (HClO₄). Standardizacija perhlorne kiseline vrši se pomoću kalijum-kiselog ftalata, u sirćetnoj kiselini, uz indikator kristalviolet. Radi pripreme titranta najpre se vrši rastvaranje perhlorne kiseline u sirćetnoj kiselini, pri čemu dolazi do formiranja konjugovanih parova, jed. (1). Za pripremu analize, trimazolin hidrohlorid se rastvara u sirćetnoj kiselini. S obzirom na to da je trimazolin hidrohlorid slaba organska baza u obliku svoje soli hidrohlorida, kiselo baznu titraciju treba vršiti u sirćetnoj kiselini uz dodatak živa(II)-acetata, jed. (2). Završna tačka titracije se može odrediti potenciometrijski ili vizuelno uz primenu indikatora (I_n). Indikatori za određivanje slabih baza u nevodenoj sredini treba da budu jako slabe baze, kako bi se rastvorili u sirćetnoj kiselini, a dosta slabije baze od baze koja se titriše. Kod titracije slabih baza, boja indikatora je kiselina (I_nH⁺) pa se promena prati do bazne boje indikatora, jed. (3). Kao odgovarajući indikator izabran je kristal violet. Titracijom dolazi do reakcije lionijum (CH₃COOH₂⁺) i liatnog (CH₃COO⁻) jona, jed. (4), dok drugi konjugovani par BH⁺ i ClO₄⁻ ne reaguje, jer su u smeši najjača kiselina i baza.

Titrant:



Indikator:



Titracija:



EKSPERIMENTALNI DEO

Trimazolin hidrohlorid, sintetizovan i standardizovan po originalnom i zaštićenom postupku [7], ustupila je farmaceutska i hemijska industrija Zdravlje-Actavis (Leskovac, Srbija). Ostali reagensi korišćeni u radu bili su odgovarajućeg spektroskopskog ili p.a. kvaliteta (Merck Chem. Ind.). Farmace-

utske preparate za analizu (Adrianol i Adrianol-T) ustupio je proizvođač Zdravlje-Actavis, Leskovac.

Sistemska analiza – prethodna ispitivanja

Priroda supstance je ispitivana žarenjem 1 g trimazolin hidrohlorida u peći, na temperaturi od 600 °C. Ostatak nakon žarenja je podvrgnut daljim analitičkim ispitivanjima.

Rastvorljivost supstance ispitivana je rastvaranjem 1 g trimazolin hidrohlorida u različitim rastvaračima (voda, alkohol, etar, aceton) odgovarajuće zapremine, analogno farmakopejskom propisu [5].

Temperatura topljenja određivana je metodom zatopljene kapilare, nakon sušenja fino sprasšenog uzorka trimazolin hidrohlorida u vakuumu, iznad silikagela, tokom 24 h.

Radi određivanja bistrine i stepena opalescencije, upoređivani su rastvori standarda trimazolin hidrohlorida ($0,5 \text{ mg cm}^{-3}$) sa poredbenim rastvorom, 5 min posle pripreme po farmakopejskom postupku [5], pri difuznoj dnevnoj svetlosti, posmatranjem duž vertikalne ose prema crnoj pozadini.

Stepen obojenosti standardnog rastvora trimazolin hidrohlorida, zapremine 2 cm^3 , koncentracije $0,5 \text{ mg cm}^{-3}$, određivan je poređenjem sa 2 cm^3 hemijski čiste vode kao poredbenim rastvorom, pri difuznoj dnevnoj svetlosti, horizontalno prema beloj podlozi.

pH vrednost standardnog rastvora trimazolin hidrohlorida ($0,5 \text{ mg cm}^{-3}$) određivana je potenciometrijskom metodom, na temperaturi od 20 °C, upotrebom pH-metra Jenco Electronics LTD, model 6007.

Relativna gustina, d_{20}^{20} , standardnog rastvora trimazolin hidrohlorida ($0,5 \text{ mg cm}^{-3}$) određena je korišćenjem piknometra.

Indeks refrakcije standardnog rastvora trimazolin hidrohlorida ($0,5 \text{ mg cm}^{-3}$) na $20 \pm 0,5 \text{ °C}$, meren je propuštanjem D linije natrijumovog spektra ($\lambda = 589,3 \text{ nm}$) na Abbe-ovom refraktometaru AR3-6D KRUS.

Određivanje koeficijenta dinamičke viskoznosti, η , standardnog rastvora trimazolin hidrohlorida ($0,5 \text{ mg cm}^{-3}$) vršeno je upotrebom kapilarnog viskozimetra po Ostvaldu, na temperaturi od 20 °C.

Provodljivost, κ , standardnog rastvora trimazolin hidrohlorida, koncentracije $0,5 \text{ mg cm}^{-3}$ određena je upotrebom konduktometra HANNA instruments HI 8820N. Konduktometar je kalibrisan po farmakopejskom postupku [5].

Elementarna analiza trimazolin hidrohlorida vršena je na instrumentu Coleman, korišćenjem mikroanalitičke metode za određivanje sadržaja C, H, N i S, nakon sagorevanja supstance, tj. potpune oksidacije. Za određivanje sadržaja C i H, tačno odmerena količina (5 mg) uzorka sagorevana je u prisustvu O_2 , nakon čega je meren sadržaj CO_2 i H_2O , a iz dobije-

nih vrednosti izračunavan sadržaj C i H. Sadržaj N je određivan Dums-ovom metodom. Uzorak je zagrevan na 800 °C u struji CO_2 , u prisustvu Cu kao katalizatora redukcije N-oksida u N_2 . Količina N u uzorku je određivana merenjem zapremine izdvojenog N_2 .

Sistemska analiza – identifikacija aktivne supstance

Identifikacija sintetizovanog trimazolin hidrohlorida, kao farmaceutske sirovine za izradu nazalnog preparata, vršena je spektroskopskim (FTIR, UV-VIS, $^1\text{H-NMR}$) i hromatografskim (HPLC) metodama, u skladu sa prvom i drugom identifikacijom prema farmakopeji [5].

UV spektri vodenog rastvora trimazolin hidrohlorida i preparata Adrianol snimani su na Varian Cary-100 Conc UV-VIS spektrofotometru, u talasnoj oblasti od 200 do 400 nm, pri sobnoj temperaturi, korišćenjem kvarčnih kveta $1 \times 1 \text{ cm}$. Za obradu spektara korišćen je Cary Win-UV softver. Instrument ima automatsko podešavanje talasne dužine sa tačnošću od 0,1 nm.

IR spektri farmaceutski standardizovanog trimazolin hidrohlorida snimani su na Bomem MB-100 (Hartmann&Braun) FTIR spektroskopu sa standardnim DTGS/KBr detektorom, 40 skeniranja u oblasti talasnih brojeva $4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$, pri rezoluciji od 2 cm^{-1} , po metodi presovanih tableta. Za pripremu uzorka korišćena je KBr tehnika. Količina od 1,5 mg uzorka homogenizovana je sa 150 mg spektroskopski čistog KBr ($\approx 1\%$ čvrst rastvor). Smeša je podvrgnuta vakuumiranju i presovanju pod pritiskom od 800 MPa, pri čemu nastaju propusne pastile. Referentna pastila pripremljena je od čistog KBr. IR spektri preparata Adrianola snimani su korišćenjem KRS-5 ćelija za tečne uzorke, na istom spektroskopu.

$^1\text{H-NMR}$ spektar trimazolin hidrohlorida sniman je na NMR spektroskopu, sa radnom frekvencijom od 400 MHz. Konstante spin-spin kuplovanja merene su upotrebom ovog instrumenta.

Hromatografsko razdvajanje i ispitivanje stepena čistoće trimazolin hidrohlorida vršeni su na Agilent 1100-Series HPLC hromatografskom sistemu, pri sledećim uslovima: kolona ZORBAX Eclipse XDB-C18 ($4,6 \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); binarna pumpa konstantnog protoka; UV detektor na talasnoj dužini 270 nm; autosempler sa injektiranom zapreminom 50 μl , mobilna faza je smeša acetonitril-voda (30:70 v/v) filtrirana na milipore filtru ($0,45 \mu\text{m}$); protok mobilne faze $1 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, pritisak 100 bara, temperatura 30 °C.

Kvantitativna titrimetrijska analiza

Odmereno je tačno 0,15 g trimazolin hidrohlorida i rastvoreno u smeši od 50 cm^3 glacijalne sirćetne kiseline i 10 cm^3 10% rastvora živa(II)-acetata. Dodate su dve kapi kristal violeta i rastvor je titrisan sa

0,1 mol dm⁻³ perhlornom kiselinom (HClO₄) do plavo-zelene boje. Istovremeno je rađena i slepa proba. Za preračunavanje je korišćen odnos: 1 cm³ 0,1 mol dm⁻³ HClO₄ odgovara 23,876 mg trimazolin hidrohloridu. Rastvor kristal violeta pripremljen je tako što je 0,5 g iste supstance rastvoreno u odmerni sud od 100 cm³ u glacijalnoj sirćetnoj kiselini i sud dopunjen do crte istim rastvaračem. Sadržaj trimazolin hidrohlorida u mas.% može se odrediti iz jednačine (5).

$$\%C_{13}H_{19}N_2Cl = \frac{(V - V_{sl}) \cdot F \cdot 23,876 \cdot 100}{W} \cdot \frac{100}{100 - a} \quad (5)$$

gde je: V – zapremina 0,1 mol dm⁻³ HClO₄ utrošena za titraciju probe (cm³), V_{sl} – zapremina 0,1 mol dm⁻³ HClO₄ utrošena za titraciju slepe probe (cm³), F – faktor molariteta za 0,1 mol dm⁻³ HClO₄, W – masa ispitivane supstance (mg), a – gubitak sušenjem kod ispitivane supstance (%).

REZULTATI I DISKUSIJA

Prethodna ispitivanja

Sintetizovan i farmaceutski standardizovan trimazolin hidrohlorid je kristalna supstanca bele boje i gorkog ukusa. Ispitivanjem ponašanja pri žarenju, s obzirom na to da se ugljeniši i izgara bez ostatka, može se zaključiti da je trimazolin hidrohlorid supstanca organskog porekla.

Elementarnom analizom ispitivanog uzorka trimazolin hidrohlorida utvrđen je sledeći sadržaj elemenata: 65,39% C, 8,02% H, 11,73% N i 14,84% Cl. Na osnovu elementarne analize potvrđena je empirijska formula C₁₃H₁₉N₂Cl ispitivane supstance koja se koristi za izradu preparata Adrianola.

Ispitivanjem rastvorljivosti ispitivanog uzorka utvrđeno je da se 1 g trimazolin hidrohlorida može lako rastvoriti u 1 cm³ vode. Na osnovu dobijenog rezultata, u skladu sa farmakopejom [5], trimazolin hidrohlorid se može svrstati u supstance dobro rastvorne u vodi. Umereno je rastvoran u etanolu, s obzirom da se 1 g supstance može rastvoriti u opsegu 30–100 cm³ etanola. Kako 1 g trimazolin hidrohlorida

Tabela 1. Parametri fizičkih ispitivanja trimazolin hidrohlorida
Table 1. Parameters of trimazolin hydrochloride physical investigations

Parametri ispitivanja	Koncentracija	Vrednosti
Temperatura topljenja (°C)	–	279–280
pH vrednost	0,5 mg cm ⁻³	5,56
Relativna gustina, d_{20}^{20}	0,5 mg cm ⁻³	1,0115
Indeks refrakcije, n	0,5 mg cm ⁻³	1,3323
Viskozitet, η (mPs)	0,5 mg cm ⁻³	91,364
Provodljivost, κ (μ S)	0,5 mg cm ⁻³	229

nije moguće rastvoriti u 10 dm³ etra i acetona, može se zaključiti da je nerastvoran u ovim rastvaračima.

Rezultati ispitivanja uzorka trimazolin hidrohlorida fizičkim metodama (temperatura topljenja, pH vrednost, relativna gustina, indeks refrakcije, viskozi-tet i provodljivost) prikazani su u tabeli 1.

Poređenjem ispitivanog rastvora trimazolin hidrohlorida (0,5 mg cm⁻³) sa referentnom suspenzijom pri difuznoj dnevnoj svetlosti, duž vertikalne ose prema crnoj pozadini [5], uočeno je da je ispitivana tečnost bistra, jer je njena bistrina ista kao i bistrina vode. Poređenjem istog rastvora sa vodom, pri difuznoj dnevnoj svetlosti, horizontalno prema beloj podlozi, pokazalo se da je rastvor bezbojan.

Kalibracija spektroskopskih uređaja

Za potrebe identifikacije trimazolin hidrohlorida kao farmaceutsko-aktivne supstance, a u skladu sa farmakopejskim propisom kontrole kvaliteta lekova, neophodna je prethodna kalibracija spektroskopskih uređaja, radi provere i potvrde radne talasne dužine, provere apsorbancije, određivanja granice rasejane svetlosti, kao i rezolucije uređaja [8,9].

a) Potvrda talasne dužine UV-VIS spektrofotometra

Skala talasne dužine potvrđena je korišćenjem standardnog rastvora holmijum(III)-perhlorata (40 g dm⁻³ holmijum(III)-oksida u rastvoru 141 g dm⁻³ perhlorne kiseline). Apsorpcioni maksimum ovog rastvora je tačno definisan za karakterističnu talasnu dužinu odgovarajuće linije vodonične lampe (tabela 2). Dozvoljena je tolerancija talasne dužine od ± 1 nm za UV, odnosno ± 3 nm za VIS oblast.

Tabela 2. Položaji apsorpcionih maksimuma u UV spektru standardnog rastvora holmijum(III)-perhlorata za odgovarajuće linije vodonične lampe

Table 2. Absorption peak positions in UV spectrum of holmium(III)-perchlorate standard solution for corresponding hydrogen lamp lines

Parametar	Talasna dužina, λ (nm)			
	UV oblast		VIS oblast	
Standardne vrednosti	241,15	287,15	361,50	536,30
Eksperimentalne vrednosti	241,46	286,72	360,81	537,40
Odstupanje	+0,31	-0,57	-0,69	+1,10

b) Provera apsorbancije UV spektra

Apsorbancija je proverena korišćenjem standardnog rastvora kalijum(I)-dihromata (60 mg u 1 dm³ 0,005 mol dm⁻³ sumporne kiseline), na odgovarajućim talasnim dužinama (tabela 3). Tolerancija apsorbancije je $\pm 0,01$. Na osnovu dobijenih eksperimentalnih vrednosti specifične apsorbancije, koje su u op-

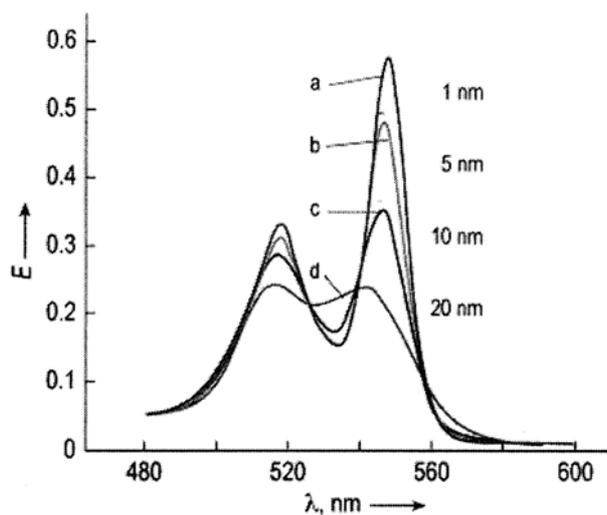
Tabela 3. Specifična apsorbancija, $A^{1\%}_{1cm}$ rastvora kalijum(I)-dihromata

Table 3. Specific absorption, $A^{1\%}_{1cm}$ of potassium(I)-dichromate solution

Talasnina dužina λ (nm)	Standardna $A^{1\%}_{1cm}$	Ekspiri-mentalna $A^{1\%}_{1cm}$	Maksimalno dozvoljena tolerancija [5]
235	124,5	124,9	122,9 – 126,2
257	144,0	143,2	142,4 – 145,7
313	48,6	49,5	47,0 – 50,3
350	106,6	107,8	104,9 – 108,2

segu maksimalno dozvoljenih tolerancija, može se zaključiti da su merne vrednosti apsorbancije validne.

Odstupanje apsorbancije se može javiti iz više razloga: velika brzina snimanja ili prevelika vremenska konstanta, prevelika izabrana širina spektralnog snopa u poređenju sa stvarnom širinom spektralnog opsega ispitivanog uzorka, preveliko rasejanje svetlosti. Ako je izabrana širina spektralnog snopa prevelika, dolazi do smanjenja visine pika i do promene apsorpcionog maksimuma. Efekat širine razreza na izgled spektra prikazan je na slici 2.



Slika 2. Efekat širine razreza na izgled spektra, za različite odnose razreza i širine trake: a) 1:20 (1 nm); b) 1:4 (5 nm); c) 1:2 (10 nm); d) 1:1 (20 nm)

Figure 2. A width slit effect on the spectrum appearance for different slit and band width ratios

Imajući u vidu navedene efekte, za dalja ispitivanja definisani su sledeći radni uslovi aparata: širina razreza 5 nm koja ne dovodi do promena u očitavanju apsorbancije, brzina snimanja 200 nm min^{-1} .

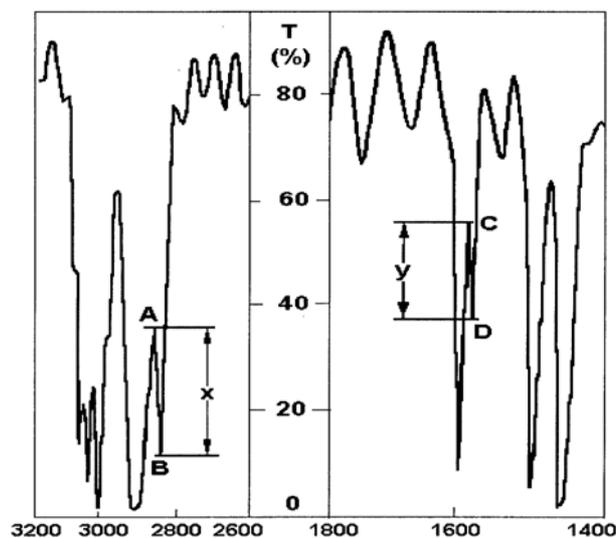
c) Granica rasejanja UV zraka

Rasejani zrak se može detektovati na talasnoj dužini korišćenjem odgovarajućih filtra ili rastvora. Tako apsorbancija standardnog rastvora KCl (12 g

dm^{-3}) u kiveti od 1 cm, na λ 200 nm, treba da bude veća od 2 u odnosu na vodu kao rastvor za kompenzaciju. Eksperimentalna merenja na UV-VIS spektrofotometru su pokazala vrednos apsorbancije od 2,7 za standardni rastvor KCl na $\lambda = 200 \text{ nm}$. Ovakav rezultat ukazuje na činjenicu da je rasejanje zraka u dozvoljenim granicama.

d) Provera performansi rezolucije FTIR spektroskopa

Snimljen je spektar standardnog polistirenskog filma debljine 0,05 mm. Razlika x (slika 3) između procenta transmisije apsorpcionog minimuma A na 2870 cm^{-1} ($3,48 \mu\text{m}$) i procenta transmisije apsorpcionog maksimuma B na 2851 cm^{-1} ($3,51 \mu\text{m}$) iznosi 23,8. Razlika y između procenta transmisije apsorpcionog minimuma C na 1589 cm^{-1} ($6,29 \mu\text{m}$) i procenta transmisije apsorpcionog maksimuma D na 1583 cm^{-1} ($6,32 \mu\text{m}$) iznosi 19,2%. Imajući u vidu da je dobijena vrednost x veća od propisane 18%, a vrednost y veća od propisane 12% [5], može se zaključiti da je rezolucija FTIR spektroskopa zadovoljavajuća.



Slika 3. Tipičan IR spektar polistirena za verifikaciju performansi rezolucije FTIR spektroskopa

Figure 3. Typical polystyren IR spectrum for verifying FTIR spectroscopy resolution performances

e) Potvrđivanje skale talasnih brojeva IR spektra

Skala talasnih brojeva je verifikovana korišćenjem polistirenskog filma, koji ima maksimume na talasnim brojevima (cm^{-1}) datim u tabeli 4. Ispitivana supstanca je pripremljena prema uputstvu datom za referentni spektar [9]. Pri istim radnim uslovima, korišćenim za potvrđivanje karakteristika rezolucije, snimljen je spektar ispitivane supstance. Dobijeni spektar je preklapljen sa spektrom standardnog polistirena i upoređivane su apsorpcione trake (tabela 4). Koristeći položaje maksimuma polistirena kao re-

Tabela 4. Poređenje apsorpcionih IR maksimuma polistirenskog filma i ispitivane supstance

Table 4. The absorption IR maxima comparison of the polystyren film and the substance investigated

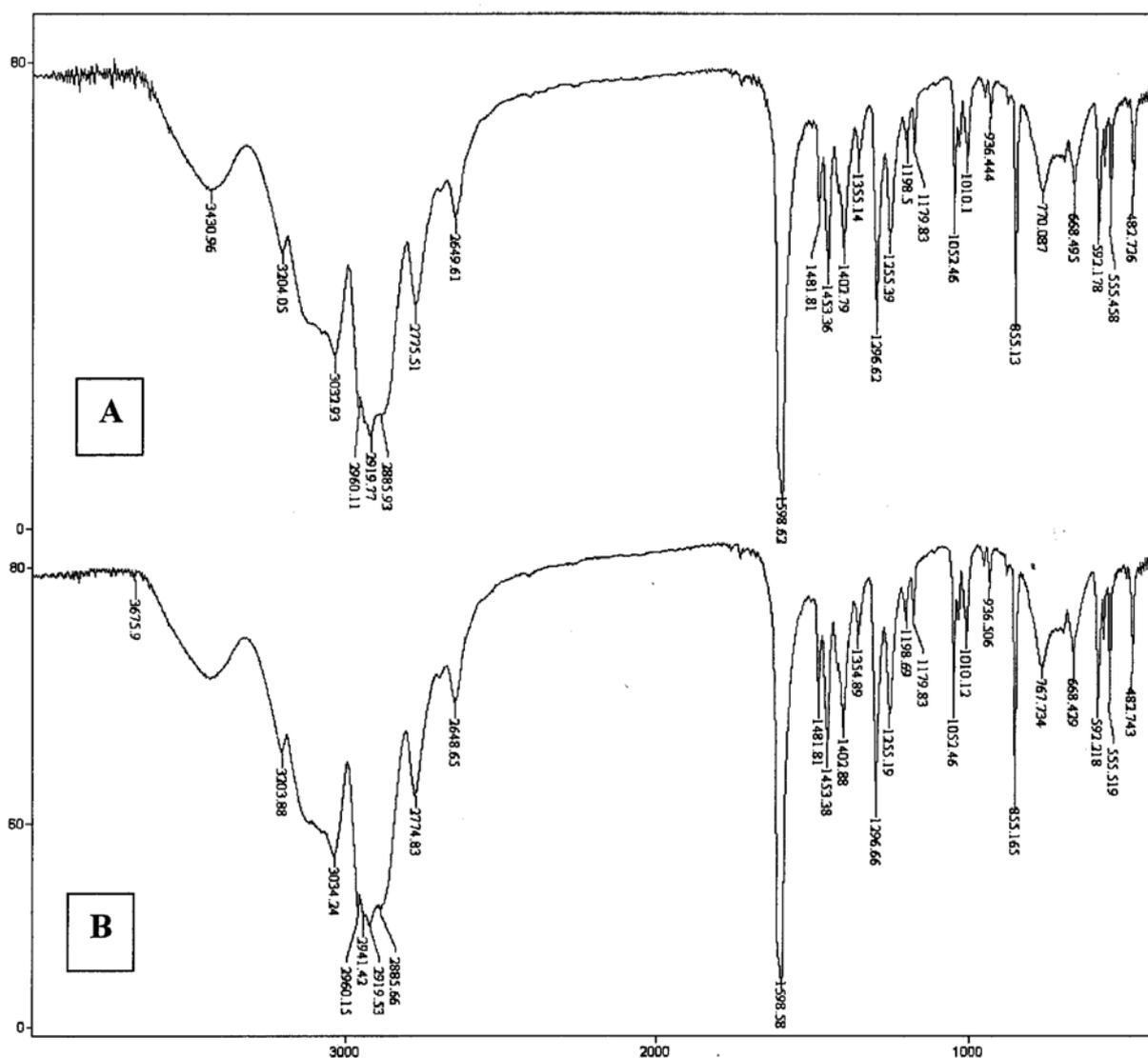
Referentne vrednosti filma	Ekspirementalne vrednosti supstance	Referentne vrednosti filma	Ekspirementalne vrednosti supstance
Talasni broj (cm ⁻¹)			
3027,1 (± 0,3)	3026,4	1583,1 (± 0,3)	1581,6
2924,0 (± 2,0)	2926,2	1181,4 (± 0,3)	1180,2
2850,7 (± 0,3)	2851,1	1154,3 (± 0,3)	1156,8
1944,0 (± 1,0)	1946,5	1069,1 (± 0,3)	1069,4
1871,0 (± 0,3)	1871,1	1028,0 (± 0,3)	1029,5
1801,6 (± 0,3)	1801,9	906,7 (± 0,3)	905,1
1601,4 (± 0,3)	1600,4	698,9 (± 0,5)	695,3

ferentne vrednosti, položaji karakterističnih maksimuma spektra ispitivane supstance, i referentnog spektra treba da odgovaraju u granicama ± 0,5% skale talasnih brojeva. Karakteristični maksimumi spektra (tabela 4) i relativni inteziteti odgovarajućih karakterističnih maksimuma za oba IR spektra su u saglasnosti.

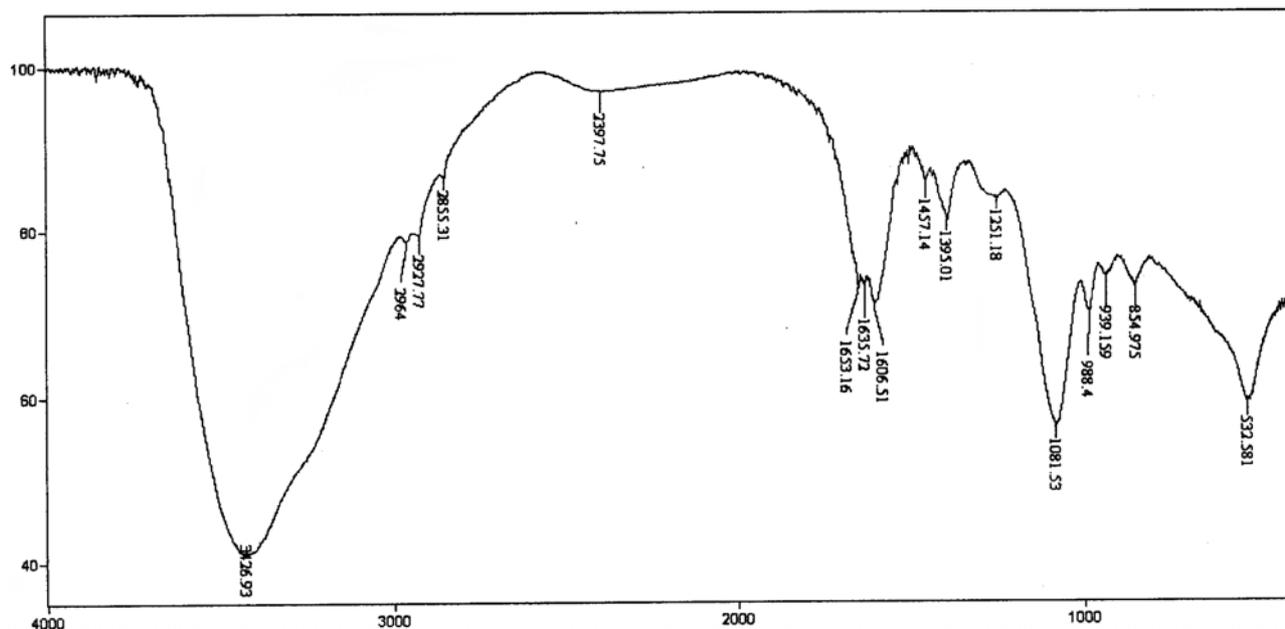
Identifikacija aktivne supstance

Uzorci standardnog i sintetizovanog trimazolin hidrohlorida, pripremljeni su KBr tehnikom za smanjenje na FTIR spektroskopu. Odgovarajući spektri su prikazani na slika 4.

Identifikacija trimazolin hidrohlorida i potvrda strukture vršena je asignacijom karakterističnih IR traka sa spektra (slika 4) pomoću literaturnih tabličnih podataka [10]. U spektru postoje karakteristične



Slika 4. FTIR spektri sintetizovanog (A) i standardnog (B) trimazolin hidrohlorida
Figure 4. FTIR spectra of synthesized (A) and standard (B) trimazolin hydrochloride



Slika 5. FTIR spektar nazalnog preparata Adrianol
Figure 5. FTIR spectrum of Adrianol nasal preparation

trake na: 3200 i 3160 cm^{-1} $\nu(\text{N-H})$ imidazolnog prstena, 3030 cm^{-1} $\nu(=\text{C-H})$ aromatičnog prstena, 2960 i 2885 cm^{-1} $\nu(\text{C-H})$ alifatičnih CH_3 grupa, 2920 i 2775 cm^{-1} $\nu(\text{C-H})$ alifatičnih CH_2 grupa, intenzivna traka na oko 1600 cm^{-1} $\nu(\text{C=N})$ od imidazolnog prstena preklapljen je sa trakom $\nu(\text{C=C})$ aromatičnog prstena. Ostale trake u deformacionoj oblasti su partneri navedenih i asigniranih vibracija. Asignirane trake u IR spektru odgovaraju strukturi trimazolin hidrohlorida (slika 1). Radi provjere čistoće aktivne supstance, vršena je korelacija spektra ispitivanog trimazolin hidrohlorida (slika 4) sa spektrom standardne supstance. Poređenjem IR spektara standardnog i sintetizovanog trimazolin hidrohlorida može se uočiti da su spektri skoro identični, što ukazuje na visoku čistoću ispitivane aktivne supstance.

Za snimanje tečnog preparata Adrianol, koji sadrži trimazolin hidrohlorid, komercijalno dostupnog u dozirnog obliku kapi, korišćena je IR tehnika tečnih uzorka. FTIR spektar nazalnog preparata Adrianola prikazan je na slici 5.

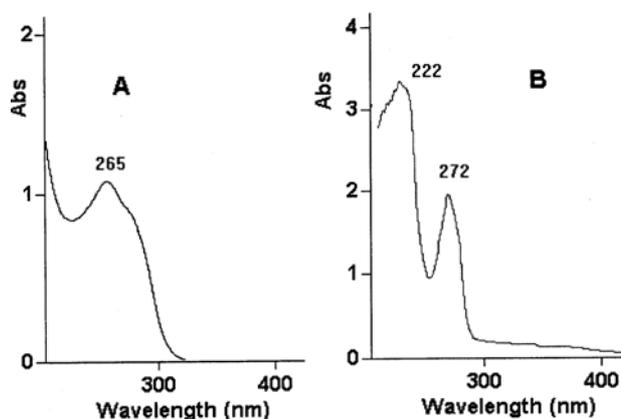
Imajući u vidu da se radi o vodenim rastvorima, nije bilo moguće jasno identifikovati prisustvo trimazolin hidrohlorida u preparatu, kao ni ostalih komponenti, s obzirom na to da sama voda asorbuje u celoj IR oblasti (3600–3000, 2500–2300, 1700–1500 i 700–400 cm^{-1}), zbog čega su ostale trake preklapljene. Pojedini maksimumi (na oko 2950, 1600, 1400, 1080, 900, 532 cm^{-1}) samo nagoveštavaju prisustvo aktivnih supstanci i pomoćnih materija. Zbog toga je bilo kakva analiza u ovom pravcu bila nemoguća bez prethodnog izolovanja trimazolin hidrohlorida iz preparata.

Radi potpunije identifikacije, ispitivani uzorci trimazolin hidrohlorid i preparat Adrianol podvrgnu-

ti su i UV spektrofotometrijskim ispitivanjima. Odgovarajući UV spektri su prikazani na slici 6.

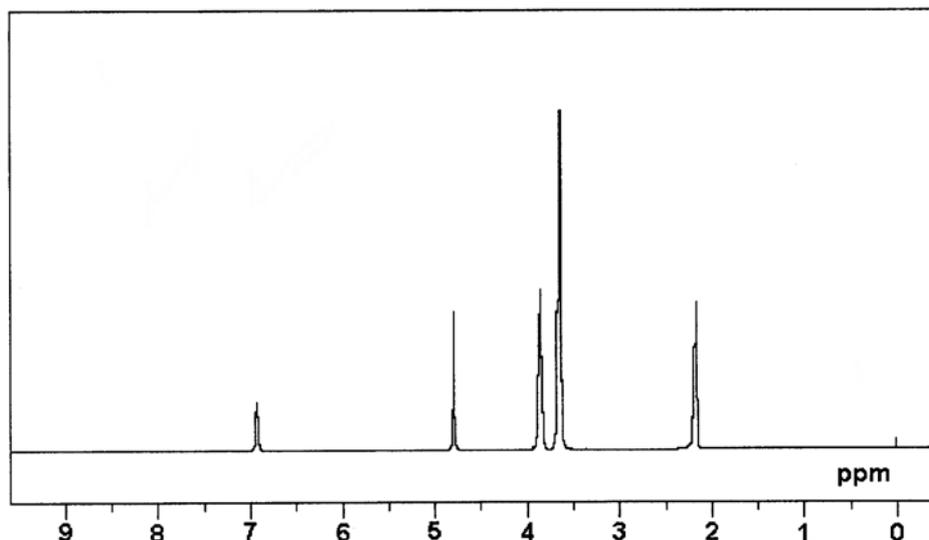
Vodeni rastvor trimazolin hidrohlorida pokazuje jednu široku, složenu apsorpcionu traku sa maksimumom na 265 nm i preгиbom na nešto većoj talasnoj dužini, verovatno od $\pi \rightarrow \pi^*$ prelaza karakterističnih hromofora, tj. konjugovanih $\text{C}=\text{C}$ veza aromatičnog jezgra i $\text{C}=\text{N}$ veze imidazolovog prstena. Slična traka je registrovana i kod preparata Adrianola sa malim batohromnim pomeranjem (272 nm), imajući u vidu da je u ispitivanom sistemu prisutan i fenilefrin sa hemijski sličnom strukturom.

$^1\text{H-NMR}$ spektar standardnog trimazolin hidrohlorida prikazan je na slici 7. Asignacijom $^1\text{H-}$



Slika 6. UV spektri ispitivanog trimazolin hidrohlorida (A) i preparata Adrianol (B)

Figure 6. UV spectra of the investigated trimazolin hydrochloride (A) and Adrianol preparation (B)



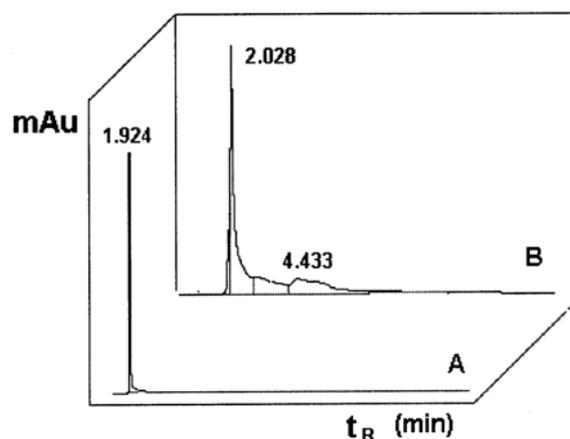
Slika 7. ^1H -NMR spektar trimazolin hidrohlorida
Figure 7. ^1H -NMR spectrum of trimazolin hydrochloride

NMR spektra ispitivanog trimazolin hidrohlorida (slika 7) identifikovano je prisustvo 5 grupe protona. Singlet na 2,2 ppm odgovara protonima CH_3 grupe supstituisanog benzenovog jezgra, singlet na 3,6 ppm odgovara protonima CH_2 grupe imidazolovog prstena, singlet na 3,9 ppm odgovara alifatičnoj CH_2 grupi, singlet na 4,8 ppm odgovara protonu NH grupe, a singlet na 6,9 ppm odgovara protonima CH grupe benzenovog jezgra. Rezultati NMR spektroskopije u saglasnosti su sa rezultatima IR ispitivanja, što potvrđuje datu strukturu (slika 1) ispitivanog sintetizovanog uzorka trimazolin hidrohlorida.

Imajući u vidu da cilj identifikacije nije bio samo potvrda hemijske strukture ispitivane supstance, već i provera da li ispitivani uzorak odgovara deklarisanom opisu proizvođača, uzorci su podvrgnuti analizi metodom tečne hromatografije na HPLC sistemu. Pre hromatografske analize ispitivanih uzoraka vršeno je verifikovanje RP-HPLC sistema, što podrazumeva kondicioniranje XDB-C18 kolone, izbor analitičke talasne dužine, ponovljivost odgovora detektora i definisanje mobilne faze. Zadati hromatografski uslovi navedeni su u eksperimentalnom delu. RP-HPLC sistem obrnutih faza ispiran je mobilnom fazom (smeša acetonitril/voda 30:70 v/v), pri konstantnom protoku ($1 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$), sve dok nije bila uspostavljena ravna bazna linija. Potom su u RP-HPLC sistem injektirani standardni rastvor koncentracije, $c = 0,5 \text{ mg cm}^{-3}$ trimazolin hidrohlorida i preparat Adrianol-T, koncentracije $c = 0,5 \text{ mg cm}^{-3}$. Odgovarajući hromatogrami prikazani su na slici 8.

Sa dobijenog hromatograma (slika 8A) određeni su retencioni parametri i efikasnost kolone. Na osnovu dobijene vrednosti visine ekvivalentne teorijskom podu ($\text{HETP} = 0,61$), može se zaključiti da je efikasnost kolone zadovoljavajuća i da je karakteriše veći broj teorijskih podova ($N = 41$). Vrednost asi-

metrije pika od 0,2 ukazuje da pik nije idealno simetričan, tj. nije Gausov pik. Imajući u vidu da je $W_{ab} < W_{bc}$, to znači da postoji izvesna interakcija između stacionarne faze i ispitivane komponente. Retenciono vreme karakterističnog pika, koje odgovara trimazolin hidrohloridu je 1,924 min. Ovaj pik omogućuje identifikaciju trimazolin hidrohlorida u preparatu. Na hromatogramu Adrianol-T (slika 8B) može se uočiti pik na 2,028 min, koji ukazuje na prisustvo trimazolin hidrohlorida. Pik je širi i preklapa se pri dužem retencionom vremenu sa pikom fenilefrina, prisutnim u ispitivanom preparatu. Približan intenzitet opisanih pikova ukazuje na mogućnost istog sadržaja trimazolin hidrohlorida u ispitivanom rastvoru čiste supstance i preparatu. Da bi se potvrdila



Slika 8. HPLC hromatogrami rastvora ispitivanog trimazolin hidrohlorida ($c = 0,5 \text{ mg cm}^{-3}$) (A) i preparata Adrianol-T ($c = 0,5 \text{ mg cm}^{-3}$) (B)

Figure 8. HPLC chromatograms of the investigated trimazolin hydrochloride solution ($c = 0.5 \text{ mg cm}^{-3}$) (A) and Adrianol-T preparation ($c = 0.5 \text{ mg cm}^{-3}$) (B)

ova činjenicu i ustanovio sadržaj trimazolin hidrohlorida u preparatu, saglasno deklarisanosti vrednosti, u daljem radu je razvijana metoda titrimetrijske analize.

Kvantitativna analiza trimazolin hidrohlorida

Imajući u vidu opisane činjenice u teorijskom delu rada, jednačine (1)–(4), razvijana je volumetrijska metoda za određivanje sadržaja trimazolin hidrohlorida u ispitivanim rastvorima standarda. Za određivanje sadržaja trimazolin hidrohlorida u ispitivanim preparatima neophodno je izvršiti ekstrakciju trimazolin hidrohlorida, radi odvajanja trimazolina od fenilefrina.

Primenom razvijenog postupka određen je sadržaj trimazolin hidrohlorida u preparatima Adriano-lu-T od 99,68% i Adrianolu od 100,66%. Nađene vrednosti od 0,49 i 1,51 mg cm⁻³, respektivno, su u skladu sa deklaracijom proizvođača i potvrđuje rezultate dobijene HPLC hromatografijom.

ZAKLJUČAK

U toku rada uspešno su sprovedene obe faze sistemske analize trimazolin hidrohlorida. Prethodnim ispitivanjem izvršena je fizičko-hemijska karakterizacija trimazolin hidrohlorida. U drugoj fazi sistemske analize, upotrebom apsorpcionih spektroskopskih metoda (FTIR, UV-VIS, ¹H-NMR) potvrđena je, sa određenim stepenom sigurnosti, hemijska struktura ispitivane farmakološki aktivne

supstance. Korišćene spektroskopske metode pokazale su se uspešne u identifikaciji i ispitivanju čistoće trimazolin hidrohlorida. Metodom tečne hromatografije na RP-HPLC sistemu, kao i volumetrijskim određivanjem sadržaja trimazolin hidrohlorida u preparatu, potvrđeno je da sastav preparata (Adrianol i Adriano-lu-T) odgovara deklarisanom opisu proizvođača.

LITERATURA

- [1] J. Karamehić, Z. Dizdarević, S. Dizdarević, Lj. Čupač-Vujčić, Klinička imunologija, XX poglavlje: Alergijski rinitis, Svjetlost, 2007, str. 393–412.
- [2] A. Goth, Medical Pharmacology Principle and Concepts, 10th ed., The Mosby C.V. Company, 1981.
- [3] <http://en.wikipedia.org/wiki/Phenylephrine>
- [4] R. Glennon, H. Law, US Patent No. 6,048,862 (2000).
- [5] Jugoslovenska farmakopeja 2000 (Ph. Jug. V), Savezni zavod za zaštitu i unapređenje zdravlja, Savremena administracija, Beograd, 2000.
- [6] Spisak regulatornih mera iz bezbednosnih razloga, Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije, 2005., www.alims.sr.gov.yu/lat/servisi/spisak.doc
- [7] S. Stankovic, N. Stojanovic, YU Pat. 46648 (1993).
- [8] Validation for Cary UV-Vis-NIR products, Varian Inc., 2005., <http://www.varianinc.com/cgi-bin/nav?products/spectr/uv/validation/>
- [9] Bomem Hartmann&Braun, The Michelson series FTIR spectrometer, Users guide, Bomem Inc., Canada, 1994.
- [10] D. Whittaker, Interpreting organic Spectra, R.S.C. Cambridge, 2000.

SUMMARY

SYSTEMATIC ANALYSIS OF TRIMAZOLIN HYDROCHLORIDE AS ADRENERGIC VASOCONSTRICTOR

(Professional paper)

Goran Nikolić¹, Ivana Savić¹, Vladimir Banković²

¹Faculty of Technology, Bulevar oslobođenja 124, 16000 Leskovac, Serbia

²Pharmaceutical Industry Zdravlje-Actavis, Vlakova 199, Leskovac 16000, Serbia

Trimazolin-hydrochloride, which is used as a pharmaceutically active component (adrenergic vasoconstrictor) for the production of decongestive preparations, was investigated in this paper by performing systematic analysis. In domestic and foreign pharmacopoeias, as well as in scientific and patent literature, there are no data on trimazolin and the methods of its investigation. Systematic analysis involves two investigation phases. A complete physicochemical characterization of the synthesized substance was done by previous investigation. In the second phase, a chemical structure of the synthesized pharmacologically active substance was confirmed to a certain degree of certainty by using the absorption spectroscopic methods (FTIR, UV-VIS, ¹H-NMR). The spectroscopic methods used proved to be successful at identifying and investigating the purity of trimazolin hydrochloride. Liquid (RP-HPLC) chromatography was used for the analysis of trimazolin hydrochloride in the nasal preparation (Adrianol). The method of titrimetric analysis was developed with the aim of quantitative determination of trimazolin hydrochloride in decongestive preparations.

Key words: Trimazolin • Vasoconstrictor • Analysis • Spectroscopy • Chromatography •

Ključne reči: Trimazolin • Vazokonstriktor • Analiza • Spektroskopija • Hromatografija •