УДК 615.074

Св.М. Коваленко, С.А. Шкляєв, С.М. Коваленко

Національний фармацевтичний університет

ВАЛІДАЦІЯ ВЕРХ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ТІОКТОВОЇ КИСЛОТИ В КОМБІНОВАНОМУ ЛІКАРСЬКОМУ ЗАСОБІ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ДІАБЕТИЧНИХ УСКЛАДНЕНЬ

Адаптована фармакопейная методика кількісного визначення тіоктової кислоти в новому комбінованому лікарському засобі. Проведена валідація розробленої методики. Показано, що валідаційні критерії методики відповідають вимогам Державної фармакопеї України для методик кількісного визначення з допусками змісту активної речовини ± 5 %.

Ключові слова: високоефективна рідинна хроматографія, тіоктова кислота, валідація.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ

Одним з основних ускладнень у хворих цукровим діабетом (ЦД) є периферична нейропатія, обумовлена частковим зниженням ендонейрональної біологічної доступності глюкози і супутнім зростанням оксидативного стресу. Проте для лікування діабетичної невропатії в даний час застосовуються переважно симптоматичні препарати, які хоча і ослабляють болі, але зовсім не впливають на течію хвороби. Але саме останнє і повинно бути метою лікування невропатії. Єдиною альтернативою симптоматичної терапії на сьогодні є α–ліпоєва (тіоктова) кислота, застосування якої є обґрунтованим з патогенетичної точки зору. Ця діюча речовина звільняє організм від вільних радикалів і є частиною власної антиоксидантної захисної системи організму. Саме окислювальний стрес грає центральну роль в патогенезі діабетичних ускладнень. Додатково тіоктова кислота покращує невропатичний дефіцит, який, як відомо, є чинником риску формування діабетичної стопи і значно підвищує ризик ампутації. Висока ефективність та хороша переносимість тіоктової кислоти при діабетичній поліневропатії вже давно підтверджені клінічними дослідженнями [1, 13, 14, 15].

Новий комбінований лікарський засіб у формі таблеток, вкритих оболонкою, що знаходиться на стадії фармацевтичної розробки та для якого на кафедрі фармакології НФаУ під керівництвом проф. Штриголя С.Ю. доведена ефективність та безпечність, окрім тіоктової кислоти, містить таурин та допоміжні речовини. Прийнятним методом визначення тіоктової кислоти є фармакопейний метод високоефективної рідинної хроматографії [12].

АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

На сьогоднішній день кількість хворих ЦД в світі перевищило 240 млн., щорічно число хворих збільшується на 5-7 %, а кожні 12-15 років – подвоюється [1,10,13,14]. Відомо, що ЦД супроводжується багатьма важкими ускладненнями: інфарктом міокарда, ішемічною хворобою серця, ретинопатією, нефропатією, нейропатією, гангреною тощо. Фармакотерапія ускладнень ЦД може здійснюватися за допомогою препаратів, що володіють комплексним позитивним ефектом.

Створення нових ефективних комбінованих лікарських засобів для лікування ЦД та його ускладнень, що не мають побічних ефектів, є актуальною проблемою сучасної фармації [5, 6].

При створенні сучасних комбінованих препаратів використовується декілька активних речовин, які поєднують у собі декілька сукупних фармакологічних ефектів і тим самим підвищують та посилюють фармакологічні дії монопрепаратів.

ВИДІЛЕННЯ НЕ ВИРІШЕНИХ РАНІШЕ ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ

Нами були розроблені новий комбінований лікарський засіб для профілактики та лікування діабетичних ускладнень на основі тіоктової кислоти та таурину [7, 8, 9] та методи контролю його якості.

© Св.М. Коваленко, С.А. Шкляєв, С.М. Коваленко, 2012

У відповідності до вимог Державної фармакопеї України ДФУ, при розробці аналітичних методик кількісного визначення діючих речовин у лікарських формах необхідно розраховувати критерії прийнятності валідаційних характеристик, розробити стандартизовану процедуру валідації аналітичних методик і провести експериментальні дослідження з вивчення метрологічних характеристик методики.

ФОРМУВАННЯ ЦІЛЕЙ СТАТТІ

Метою даного дослідження була адаптація фармакопейної методики та її валідація для кількісного визначення тіоктової кислоти в новому комбінованому лікарському засобі.

ВИКЛАД ОСНОВНОГО МАТЕРІАЛУ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єкти дослідження, застосовані реагенти та обладнання

Об'єктами дослідження був комбінований лікарський засіб, одна таблетка, вкрита оболонкою, якого містить: 300 мг тіоктової кислоти, 250 мг таурину та допоміжні речовини: мікрокристалічна целюлоза, повідон, крохмаль кукурудзяний, натрію кроскармелоза, гіпромелоза, аеросил, магнію стеарат, опадрай 11 жовтий.

У роботі було використано реактиви і розчинники: РСЗ тіоктової кислоти; калію дигідрофосфат; фосфорна кислота; метанол; ацетонітрил; вода очищена.

Аналітичне обладнання: рідинний хроматограф Prostar-210 фірми «Varian Chromatography System», США, ваги електронні Precisa XT 220A, мірний посуд класу А.

Загальна методика кількісного визначення тіоктової кислоти

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі в наступних умовах:

- колонка apHera™ C18 Polymer розміром 150×4,6 мм, яка заповнена сорбентом с розміром часток 5 мкм;
- рухома фаза: суміш 8 об'ємів ацетонітрилу, 41 об'єму 0,7 г/л розчину калію дигідрофосфату (pH 3,0) та 51 об'єму метанолу;
- детектування за довжини хвилі 215 нм;
- температура колонки 35 °С;
- швидкість елюенту: 0,7 мл/хв;
- об'єм дозування: 50 мкл.

ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ

Валідаційні критерії [2]. Невизначеність пробопідготовки, специфічність, лінійність, збіжність, правильність, стабільність, внутрішньолабораторна точність. Процедура проведення валідації докладно викладена у [3, 4].

Запасний розчин тіоктової кислоти в розчиннику (суміш рівних об'ємів ацетонітрилу та 0,7 г/л розчину калію дигідрофосфату (pH 3,0) концентрацією 0,5 мг/мл.

Модельні розчині готують із запасного розведенням розчинником до концентрацій 0,03 мг/мл – 0,07 мг/мл.

«Плацебо». Виходячи із складу препарату, до «плацебо» входили таурин, мікрокристалічна целюлоза, повідон, крохмаль кукурудзяний, натрію кроскармелоза, гіпромелоза, аеросил, магнію стеарат, опадрай 11 жовтий.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Невизначеність пробопідготовки. Виходячи з методики приготування розчинів та використання методу високоефективної рідинної хроматографії, повна прогнозована невизначеність методики становить $1{,}49 < \Delta_{As} = 3{,}2$. Отримані данні свідчать про відсутність впливу пробопідготовки на результати визначення.

Специфічність, правильність, збіжність. Типові хроматограми розчину «плацебо» (а), стандартного розчину (б) та випробуваного розчину (в) представлені на рис. 1.

На хроматограмі «плацебо» відсутні піки, які можуть заважати визначенню, лише піки, відповідні розчиннику, що вказує на специфічність методики. В табл. 1 наведено визначення валідаційних критеріїв «правильність» та «збіжність».

З даних таблиці 1 можна побачити виконання критеріїв «правильність» та «збіжність» вимогам ДФУ.

Лінійність. За отриманими даними була побудована калібрувальна пряма, яка відображена на рис. 2.

В табл. 2 наведено визначення валідаційних критеріїв «лінійність».

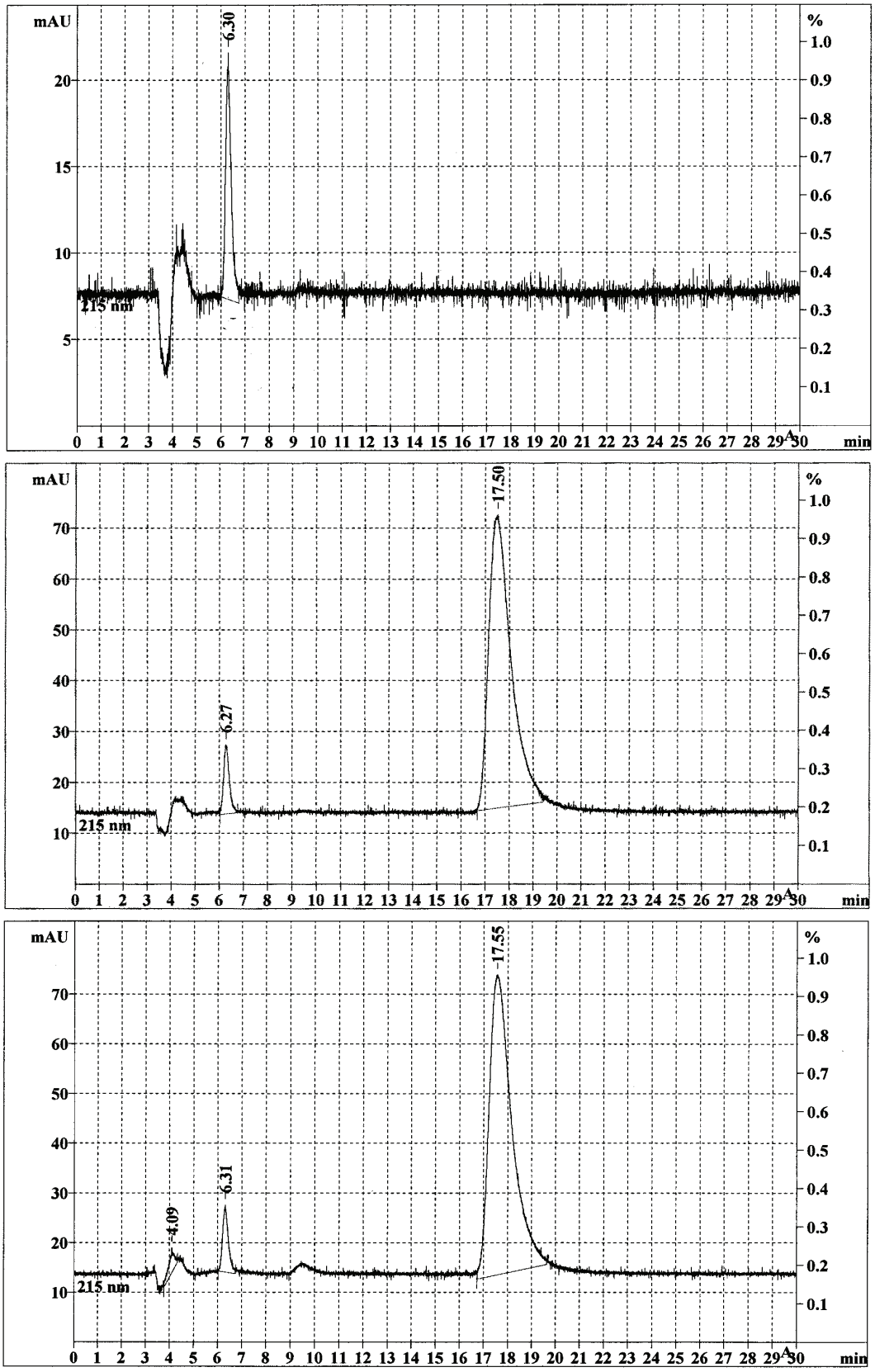

Рис. 1. *Типові хроматограми розчину «плацебо» (а), стандартного розчину (б) та випробуваного розчину (в).*

Таблиця 1

ВИХІДНІ ДАНІ ТА РЕЗУЛЬТАТИ ВИЗНАЧЕННЯ ВАЛІДАЦІЙНИХ КРИТЕРІЇВ «ПРАВИЛЬНІСТЬ» ТА «ЗБІЖНІСТЬ»

№ модельного розчину	Концентрація модельного розчину, мг/мл	Концентрація в нормалізованих координатах, Xi, %	Середнє значення площ піків	Середнє значення площ піків в нормалізованих координатах, Yi,%	$Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \times 100\%$
Стандартний розчин	0,05		3727,6775		
1	0,03	60,00	2233,3697	59,91	99,86
2	0,035	70,00	2595,6387	69,63	99,47
3	0,04	80,00	2991,5203	80,25	100,31
4	0,045	90,00	3379,9325	90,67	100,75
5	0,05	100,00	3734,7320	100,19	100,19
6	0,055	110,00	4126,8789	110,71	100,64
7	0,06	120,00	4485,4131	120,33	100,27
8	0,065	130,00	4847,6821	130,05	100,04
9	0,07	140,00	5153,9302	138,26	98,76
Середнє Z =				100,03	
Стандартне відхилення SD_Z =				0,61	
Довірчий інтервал Δ % = t(0,95 %, f)×SD_z =				1,14	< max Δ_{As}=1,6
Перевірка незначущості систематичної похибки					
Систематична похибка d[Z-100]=				0,03	<0,38
					<0,51

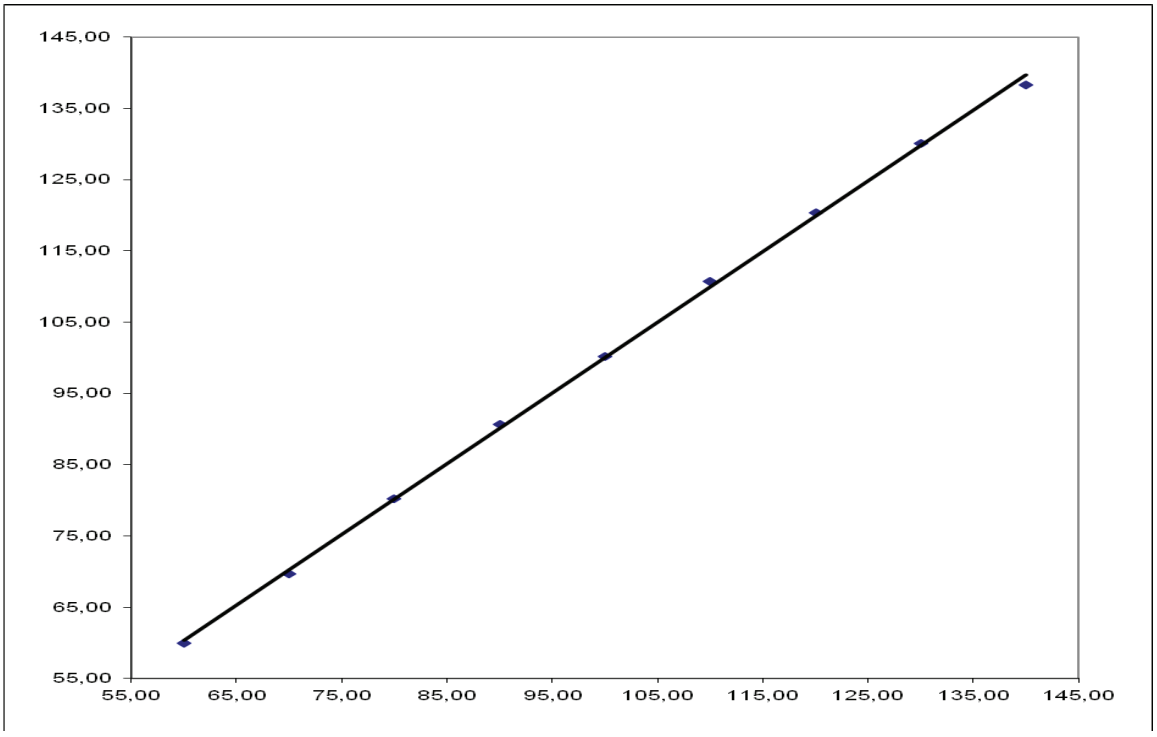

Рис. 2. *Калібрувальна пряма залежності площ піків тіоктової кислоти в модельних розчинах від її концентрації в них.*

Таблиця 2

ВИЗНАЧЕННЯ ВАЛІДАЦІЙНИХ КРИТЕРІЇВ «ЛІНІЙНІСТЬ»

Критичний параметр	Отриманий результат	Максимальне значення
Число ступенів свободи (f)	7	
Коефіцієнт Стьюдента ($t_{(0,95,f)}$)	2,36	
Кут нахилу ($b \pm S_b$)	0,99±0,01	
Вільний член ($a \pm S_a$)	0,8±0,9	<1,87
Залишкове стандартне відхилення (RSD_0)	0,61	<0,85
Коефіцієнт кореляції ($r_{(x)}$)	0,99967	>0,99945
Ліміт визначення	3,31	
Ліміт кількісного визначення	10,02	

Як видно з табл. 2, можна побачити виконання критерію «лінійність» вимогам ДФУ.

Внутрішньолабораторна точність. На підставі визначення тіоктової кислоти в зразках в 3 різні дні різними хіміками встановлена відсутність впливу випадкових факторів при відтворюванні методики в лабораторії: критерій прийнятності $\Delta Z_{intra} = 1{,}4 < \max\Delta_{As} = 1{,}6$.

Стабільність розчинів визначали протягом 6 годин. У визначений термін встановлена стабільність розчинів та їх придатність для проведення ВЕРХ аналізу: критерій прийнятності $0{,}48 < \max\delta = 0{,}512$.

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ РОЗВІДОК

1. Адаптована фармакопейна методика для кількісного визначення тіоктової кислоти в новому комбінованому лікарському засобі.
2. Проведена валідація розробленої методики. Показано, що валідаційні критерії відповідають вимогам ДФУ до методик кількісного визначення із допусками вмісту активної речовини ± 5 %.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Балаболкин М.И. Диабетология.— М.: Медицина, 2000. — 672 с.
2. Валідація аналітичних методик і випробувань//Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – С. 58-67. – Доповнення 1. – 2004. – С. 2-4. – Доповнення 2. – 2008. – С. 85-100.
3. Гризодуб А.И. Валидация спектрофотометрических методик количественного анализа лекарственных средств в соответствии с требованиями ГФУ // Фармаком. – 2002. – № 3 – С. 42-50.
4. Стандартизованная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта / А.И. Гризодуб, Д.А. Леонтьев, Н.В. Денисенко [и др.] // Фармаком. – 2004. – № 3, – С. 3-17.
5. Коваленко Св.М. Актуальність створення сучасних препаратів для лікування і профілактики ускладнень цукрового діабету на основі тауріну // Український вісник психоневрології – Т. 18, вип.2 (63). – 2010. – С. 85-86.
6. Коваленко Св.М. Обгрунтування актуальності розробки комбінованих лікарських засобів на основі тіоктової кислоти / Св.М. Коваленко// Матеріали Всеукр. наук. конф. – Х.: Вид-во НФаУ, 2011. – С 203.
7. Коваленко Св.М. Розробка складу комплексного лікарського препарту у формі таблеток для лікування діабетичних ускладнень / Св.М. Коваленко // матеріали Міжнарод. конф. студентів та молодих вчених [«Молодь – медицині майбутнього»]. – Одеса. – 2012. – С. 80-81.
8. Коваленко Св.М. Вибір допоміжних речовин при створенні комбінованих таблеток для лікування діабетичних ускладнень / Св.М. Коваленко // зб. наук. праць. «Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології» // – Вип. 1 (109). – Київ-Луганськ. – 2012. – С. 333-340.
9. Коваленко Св.М. Дослідження деяких властивостей субстанцій таурину та тіоктової кислоти з метою створення комбінованого препарату для лікування діабетичних ускладнень/ Св.М. Коваленко//Актуальні питання медичної науки та практики. – Запоріжжя, – 2012. – № 2 (9). – С. 33-36.
10. Сучасні аспекти пероральної фармакотерапії цукрового діабету 2 типу. – Монографія. [В.П. Черних, Л.М. Малоштан, Н.І. Горбенко та інш.]. – Харків. – «Буркун і К». – 2010. – 205 с.
11. American Diabetes Association: Standards of medical care in diabetes 2008//Diabetes Care. – 2008. – Vol. 31, Suppl. 1. – P. 12–54.
12. British Pharmacopoeia, 2008, Vol. II, Thioctic acid. 2123 p.
13. Huizinga M. Weight-loss pharmacotherapy: a brief review//Clinical Diabetes. – 2007. – Vol. 25, № 4. – P. 135-140.
14. Zimmet P., Alberty K.G.M.M., Shaw J. Global and societal implcations of the diabet epidemic //Nature. – 2001. – Vol. 414. – P. 782-787.

15. Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the anti-oxidant alpha-lipoic acid: a meta-analysis / D. Ziegler, H. Nowak, P. Kempler, Vargha P Low P.A.// Diabetic Medicine 2004, 21:114-121.

УДК 615.074

Св.Н. Коваленко, С.А. Шкляев, С.Н. Коваленко

ВАЛИДАЦИЯ ВЭЖХ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИОКТОВОЙ КИСЛОТЫ В КОМБИНИРОВАННОМ ЛЕКАРСТВЕННОМ СРЕДСТВЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ДИАБЕТИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ

Адаптирована фармакопейная методика количественного определения тиоктовой кислоты в новом комбинированном лекарственном средстве. Проведена валидация разработанной методики. Показано, что валидационные критерии методики соответствуют требованиям Государственной фармакопеи Украины для методик количественного определения с допусками содержания активного вещества ± 5 %.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, тиоктовая кислота, валидация.

UDC 615.074

Sv.M.Kovalenko, S.A.Shkliaiev, S.M.Kovalenko

HPLC PROCEDURE VALIDATION OF THIOCTIC ACID DETERMINATION IN THE COMPLEX MEDICINE FOR TREATMENT OF DIABETIC COMPLICATIONS

The pharmacopoeia definition procedure of thioctic acid by a high performance liquid chromatography in the new complex medicine was adopted and validated. It was shown that the validation criteria of the procedure is conformed to the requirements of the State pharmacopoeia of Ukraine for assay with limits of active ingredients ± 5 %.

Key words: high performance liquid chromatography, thioctic acid, validation.

Адреса для листування:
61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4
Кафедра товарознавста НФаУ
Тел: (0572) 67-88-52
E-mail: lana_koval@mail.ru

Надійшла до редакції:
05.06.2012