

УДК: 615.322:543.421/.424

© Гарна С.В., Савченко Л.П., Георгіянц В.А., 2011

ВАЛІДАЦІЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ СУМИ АМІНОКИСЛОТ У РОЗЧИНІ ДЛЯ ПИТТЯ “СЕДАВІТ”**Гарна С.В., Савченко Л.П., Георгіянц В.А.***Національний фармацевтичний університет, Харків*

Вступ. За даними ВООЗ число хворих на невроз за останні десятиріччя значно збільшилось, що обумовлено сучасним соціально-економічним станом та впливом різноманітних факторів навколишнього середовища, які мають негативний вплив на нервову систему людини [6, 9]. Препаратами вибору для лікування патологічних станів центральної нервової системи є седативні засоби рослинного походження, які характеризуються високою ефективністю, безпечністю, відсутністю звикання та виникнення побічних ефектів, простою дозування і застосування. Комплекс біологічно активних речовин комбінованих фітопрепаратів обумовлює широкий спектр дії та впливає як на уражену систему організму, так і на весь організм в цілому, збільшуючи при цьому опірність організму до негативних факторів. За даними експертів ВООЗ та ЄС на сьогоднішній день доцільною є реалізація програм по виробництву та стандартизації ефективних та безпечних лікарських засобів рослинного походження [3,8].

Одним із лікарських засобів, що використовуються для лікування нервових розладів є розчин для пиття “Седавіт”, створений на основі лікарських рослин та вітамінів, які позитивно впливають на функцію нервової та серцево-судинної системи та забезпечують седативну, анксиолітичну дію, підсилюють працездатність при розумовому та фізичному навантаженні [3,8]. До складу лікарського засобу “Седавіт” входять цілий ряд БАР, в тому числі й амінокислоти, які відіграють велику роль у функціонуванні різноманітних систем і органів людського організму. Особливо це стосується незамінних амінокислот, які не синтезуються в організмі людини, а потрапляють разом з продуктами рослинного та тваринного походження. Практично усі квіткові рослини містять амінокислоти в надземних та підземних органах [5]. При дефіциті будь якої амінокислоти спостерігаються специфічні розлади життєдіяльності організму, порушення обміну речовин, знижується працездатність, опір організму несприятливим факторам навколишнього середовища. Тривале білкове голодування в дитячому віці призводить до затримки росту та розумового розвитку. Амінокислоти та продукти гідролізу білків мають специфічну біологічну активність і все частіше використовуються для лікування та профілактики різних захворювань, в тому числі в неврологічній практиці. Науковими дослідженнями підтверджено, що амінокислоти здатні зменшувати негативну дію стресу на організм, підсилювати розумові здібності, покращувати пам'ять. Використовуються для лікування деяких видів депресії, безсоння, при наркологічних захворюваннях, піднімають настрій і тонус [7, 10].

Одним із методів визначення суми амінокислот в рослинній сировині є спектрофотометрія в видимій області спектру. Спектро-

фотометричний метод заснований на утворенні комплексу амінокислот з нінгідрином, що має синьо-фіолетове забарвлення, інтенсивність якого залежить від кількості суми амінокислот [4].

Розчин для пиття “Седавіт” є комплексним препаратом і на результати визначення суми амінокислот методом спектрофотометрії можуть впливати наявність інших БАР і компонентів, які входять до його складу.

З огляду на це та враховуючи вимоги ДФУ [1] нами була поставлена мета дослідження – валідація методики кількісного визначення суми амінокислот в лікарському засобі “Седавіт” методом спектрофотометрії.

Матеріали та методи дослідження. Для проведення досліджень використовувався спектрофотометр «SPECORD 200», реактиви, які відповідають вимогам ДФУ, розчин для пиття “Седавіт” серії 570710 та мірний посуд класу А. Визначення проводили за методом абсорбційної спектрофотометрії в видимій області (2.2.25) [1]. Отримані результати були піддані статистичній обробці. Статистичну обробку експериментальних даних проводили відповідно до статті ДФУ “Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту”^N [2].

Методика кількісного визначення суми амінокислот:

– *випробуваний розчин:* 2,00 мл препарату поміщають у мірну колбу місткістю 25,00 мл, доводять об'єм розчину 96 % спиртом до мітки і перемішують. Отриманий розчин фільтрують, відкидаючи перші 5,00 мл фільтрату. 2,00 мл фільтрату поміщають у круглодонну колбу місткістю 50,00 мл, додають 2,00 мл 0,2 % розчину нінгідрину, приєднують зворотний холодильник і нагрівають в киплячій водянній бані протягом 5 хв. Потім розчин охолоджують до кімнатної температури, переносять за допомогою двох порцій по 10,00 мл спирту ізопропілового у мірну колбу місткістю 25,00 мл, доводять об'єм розчину спиртом ізопропіловим до мітки і перемішують.

Вимірюють оптичну густину отриманого розчину на спектрофотометрі при довжині хвилі 573 нм у кюветі з товщиною шару 10мм, використовуючи в якості розчину порівняння спирт ізопропіловий.

Вимірювання проводять при температурі (20±1) °С за однакових умов з мінімальним інтервалом у часі.

– *модельні розчини* для визначення суми амінокислот готували, використовуючи рівномірний розкид концентрації суми амінокислот від номінальної на всьому діапазоні застосування методики від 80 до 120%.

– *розчин плацебо:* 2,00 мл препарату поміщають у мірну колбу місткістю 25,00 мл, доводять об'єм розчину 96 % спиртом до мітки і перемішують. Отриманий розчин фільтрують, від-

кидаючи перші 5,00 мл фільтрату. 2,00 мл фільтрату поміщають у мірну колбу місткістю 25,00 мл, доводять об'єм розчину спиртом ізопропіловим до мітки і перемішують.

– 0,2 % розчин нінгідрину: 0,1 г нінгідрину поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняють у 30 мл спирту ізопропілового, доводять об'єм розчину тим же розчинником до мітки і перемішують.

Вміст суми амінокислот (X_i) у 1,00 мл препарату, в перерахунку на лейцин, у грамах, обчислюють за формулою:

$$X_i = \frac{D \times 25 \times 25}{862 \times 2 \times 2 \times 100} = \frac{D \times 25}{862 \times 16} \quad (1)$$

де D – оптична густина випробуваного розчину;

862 – питомий показник поглинання комплексу лейцину з нінгідрином в спирті ізопропіловому при довжині хвилі 573 нм.

Вміст суми амінокислот повинен становити не менше 0,0007 г в 1,00 мл препарату.

Результати дослідження та їх обговорення. За зазначених умов нами був одержаний спектр поглинання розчину «Севавіт (рис.1), що має наявний максимум при довжині хвилі 564 нм.

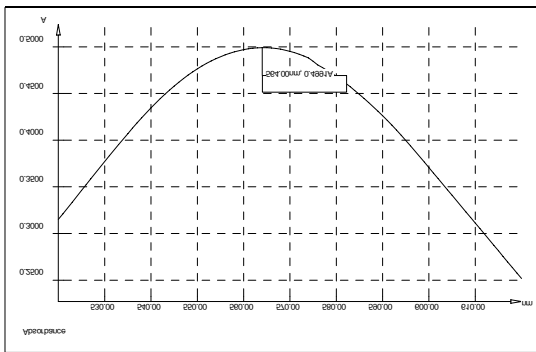


Рис.1. Спектр поглинання розчину «Севавіт».

При проведенні кількісного визначення суми амінокислот методом спектрофотометрії було обрано діапазон застосування методики від 80 до 120% від номінального вмісту амінокислот в 1,00 мл препарату (0,0007 г) та обрані допуски вмісту $\pm 10\%$ за вимогами ДФУ [1].

Вивчення валідаційних характеристик та їх оцінка. При проведенні валідації були визначені всі

Таблиця 1. Результати дослідження робастності методики

Вивчення стабільності				Вивчення впливу змін рН				
середнє	RSD _r , %	Δ_r , %	max δ , %	середнє	Sr _{рН}	RSD _{рН} , %	$\Delta_{рН}$, %	max δ , %
0,4991	0,18	0,38	1,06	0,4992	0,0003	0,025	0,07	1,06

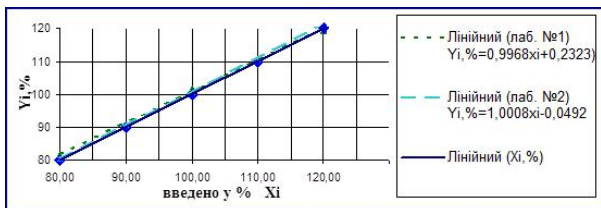


Рис. 2. Графік залежності оптичної густини від концентрації амінокислот в нормалізованих координатах.

Дослідження лінійності є основним при валідації методики кількісного визначення. Дослідження лінійності проводили на 5 модельних роз-

необхідні за ДФУ [1] валідаційні характеристики (специфічність, лінійність, правильність, збіжність, робастність та відтворюваність).

Специфічність підтверджується результатами дослідження відносної систематичної похибки, яка вноситься допоміжними речовинами у процес визначення речовини. Вимірювання оптичної густини розчину плацебо (A_{blank}) виконували три рази з вийманням кювети за довжини хвилі 573 нм. Паралельно вимірювали оптичну густина розчину порівняння A_{st} у номінальній концентрації. Розрахунки проводили за формулою:

$$\delta_{exc} = \frac{100 \times A_{blank}}{A_{st}}$$

Критерієм незначимості впливу плацебо є виконання нерівності:

$$\delta_{exc} \leq 0,32 \times \delta = 0,32 \times 0,32 \times \max \Delta_{As} = 0,033 \times B$$

($\delta_{exc} \leq 0,33\%$). Дослідження показали, що вплив плацебо для випробуваного розчину

($A_{st} = 0,4991$, $A_{blank} = 0,018$) становить $\delta_{exc} = 3,61\%$,

отже, фонове поглинання є значущим, тому нами рекомендовано використовувати при дослідженнях в якості розчину порівняння розчин плацебо.

Для оцінки робастності методики проводили дослідження впливу зміни рН середовища на стабільність оптичного поглинання модельних розчинів з концентраціями 90 %, 100 %, 110 % та дослідження стабільності аналітичних розчинів у часі (впродовж години).

При дослідженні впливу зміни рН відтворювали його коливання $\pm 10\%$. Для отриманих модельних розчинів вимірювали оптичну густина при обраній довжині хвилі. Як видно з одержаних результатів (табл. 1), незначні коливання рН не заважають впливу на результати аналізу.

Перевірку стабільності у часі Δ_r аналітичного розчину проводили впродовж години (через кожні 15 хвилин). Встановлено, що впродовж зазначеного часу оптичне поглинання розчину є стабільним, що підтверджується відповідністю одержаних результатів критеріям прийнятності (табл. 1).

чинах на всьому діапазоні застосування методики з врахуванням рівномірного розкиду концентрацій (80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %). Лінійність характеризують залишкове стандартне відхилення Srest, коефіцієнт кореляції методики r та вільний член лінійної залежності a (табл. 2). За отриманими результатами при дослідженні лінійності було побудовано графік лінійної залежності оптичної густини від концентрації амінокислот в нормалізованих координатах (рис. 2).

Одночасно з вивченням лінійності проводилось вивчення правильності та прецизійності з використанням отриманих даних за стандартизованою про-

цедурою. Довірчий інтервал Δ_{As} одиничного значення характеризує прецизійність (Δ_{As}), а систематична похибка (δ) – правильність (табл. 3). Проведені дослідження дозволили встановити, що отримані па-

раметри відповідають вимогам ДФУ та не перевищують критичні значення. Об'єднані величини метрологічних характеристик свідчать про відтворюваність методики ($\Delta_{Z_{int.ra}}$ та $\delta_{Z_{int.ra}}$) (табл. 2).

Таблиця 2. Результати валідації методики спектрофотометричного визначення суми амінокислот

Валідаційні характеристики	Лаб. № 1	Лаб. № 2	Критерій прийнятності
S_{rest}	0,072	0,079	$S_0 \leq 0,33 \times \max \Delta_{As} = 1,06$
r	1,000	1,000	$R_c \geq 0,9978$
a	-0,0492	0,2323	$a \leq 1,02 \times S_a$
Критерій невизначеності a	$\leq 0,2299$	$\leq 0,2699$	
$\delta_{RL,80}$	0,018	0,032	$\delta_{RL,80,120} \leq 2,13$
$\delta_{RL,120}$	0,039	0,13	
Δ_{As}	0,45	1,42	$\leq 3,2$
δ_Z	0,68	0,79	$\leq 2,13$
$\Delta_{Z_{int.ra}}$		0,27	$\leq 1,06$
$\delta_{Z_{int.ra}}$		0,74	$\leq 2,13$

Оцінка отриманих валідаційних характеристик свідчить, що дана методика може використовуватись для кількісного визначення суми амінокислот у лікарському засобі "Севавіт".

Висновки:

1. Здійснено валідацію спектрофотометричної методики кількісного визначення суми амінокислот у препараті «Севавіт» за необхідними валідаційними характеристиками. Отримані метрологічні характеристики методики не переви-

щують критерії прийнятності, встановлені ДФУ.

2. В якості розчину порівняння при проведенні спектрофотометрії рекомендується використовувати розчин плацебо для зменшення впливу фонового поглинання.

3. Отримані результати свідчать про можливість використання даної методики для кількісного визначення суми амінокислот у розчині для пиття "Севавіт".

ЛІТЕРАТУРА:

1. Державна Фармакопея України / Держ. п-во "Науково-експертний фармакопейний центр". – 1-е вид. – Х.: РІРЕГ, 2001. – 556 с.
2. Державна Фармакопея України / Держ. п-во "Науково-експертний фармакопейний центр". – 1-е вид., доп.1. – Х.: РІРЕГ, 2004. – 520 с.
3. Гарна С.В. Обґрунтування складу лікарського засобу седативної дії / С.В. Гарна, А. І. Русинов, В. А. Георгіяц, Н.Ф.Маслова, С.В.Лукашов // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки і практики. – 2010. – Вип. XXIII. – № 2. – С. 13–16.
4. Исследование аминокислотного состава сфагнуа бурога / Н. А. Буркина, Г. И. Калинин, Л. В. Фоминих, Л. В. Курдюкова // Химия растительного сырья. – 2010. – № 1. – С. 81–83.
5. Западнюк В.И. Аминокислоты в медицине / В.И.Западнюк, Л.П.Кураш, М.И.Заика – К.: Здоров'я, 1982. – 200с.
6. Зупанец І.А. Фармацевтическая опека: симптоматическое лечение тревожных состояний / И.А.Зупанец, Н.В.Бездетко // Провизор. 2002. – № 24.
7. Козловский А.В. Аминокислоты и их производные в коррекции метаболических нарушений при наркологических заболеваниях/ А.В.Козловский, В.В.Лелевич, А.Г.Винницкая и др. // Медицинские новости. – 2004. - № 7. – С.27-33.
8. Маслова Н.Ф. Приоритетные направления работы лаборатории биохимической фармакологии ГП ГНЦЛС. Сообщение 3. Фармакологические аспекты создания оригинальных отечественных седативных средств на основе растительных компонентов и витаминов / Н.Ф.Маслова, С.В.Лукашов // Фармаком. – 2005. - № 2/3. – С. 46-48.
9. Ушкалова А. В. Эффективность и безопасность антидепрессивных и седативных средств растительного происхождения // А. В. Ушкалова, Т. С. Илларионова // Фарматека. – № 20. – 2007. – С. 10–14.
10. Формазюк В.И. Энциклопедия пищевых лекарственных растений. /Под ред. Н.П. Максютинной. – К.: Издательство А.С.К., 2003. – 792с.

Гарна С.В., Савченко Л.П., Георгіяц В.А. Валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення суми амінокислот у розчині для пиття "Севавіт" // Український медичний альманах. – 2011. – Том 14, № 5. – С. 37-39.

Вперше здійснено валідацію спектрофотометричної методики кількісного визначення суми амінокислот у лікарському засобі "Севавіт" у відповідності до вимог ДФУ. Отримані величини валідаційних характеристик не перевищують розрахованих критеріїв прийнятності, що дозволяє рекомендувати дану методику для аналізу вмісту суми амінокислот у досліджуваному лікарському засобі.

Ключові слова: валідація, кількісний аналіз, спектрофотометрія, амінокислоти.

Гарная С. В., Савченко Л. П., Георгияц В. А. Валідация спектрофотометрической методики количественного определения аминокислот в растворе "Севавит". Харьков, Украина // Украинский медицинский альманах. – 2011. – Том 14, № 5. – С. 37-39.

Впервые проведена валідация спектрофотометрической методики количественного определения суммы аминокислот в растворе «Севавит» в соответствии с требованиями ГФУ. Полученные величины валідационных характеристик не превышают рассчитанные критерии приемлемости, что позволяет рекомендовать данную методику для анализа содержания суммы аминокислот в исследуемом лекарственном средстве.

Ключевые слова: валідация, количественный анализ, спектрофотометрия, аминокислоты.

Garnya S.V., Savchenko L.P., Georgiyants V.A. Validation of spectrophotometric method of quantitative determination of amino acids in solution "Sedavit" // Украинский медицинский альманах. – 2011. – Том 14, № 5. – С. 37-39.

Validation of the spectrophotometric method of quantitative of the sum of amino acids in solution "Sedavit" in accordance with the requirements of the State Pharmacopeia of Ukraine has been carried out for the first time.

Received values of the validation characteristics do not exceed the calculated admissibility criteria that allows you to recommend this method for the analysis of the sum of amino acids in the investigated drug.

Key words: validation, quantitative analysis, spectrophotometry, amino acids.

Надійшла 13.06.2011 р.
Рецензент: проф. І.О.Комарецька