МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ ЛІПОЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПАНКРЕАТИНУ

П.С.Янченко, В.М.Ковальов, А.М.Комісаренко

Національна фармацевтична академія України

Ключові слова: ферментні препарати; ліполітична активність; методи визначення

У зв'язку з переходом вітчизняної фармацевтичної промисловості до стандартів GMP виникла необхідність розробки нових методів визначення ліполітичної активності вітчизняних ферментних препаратів, які б відповідали Європейській фармакопеї. Запропонований метод визначення ліполітичної активності препарату "Панкреатин", що полягає в безупинному титруванні середовища ліполітичної реакції з підтримкою певного значення pH за допомогою потенціометра. Метод характеризується відтворюваністю та точністю, а також універсальністю та простотою виконання.

У 1996 році Україна задекларувала наміри переходу вітчизняної фармацевтичної промисловості до стандартів GMP (ISO 9000 та EN 45000) [5]. У зв'язку з цим виникла необхідність розробки нових методів визначення ліполітичної активності вітчизняних ферментних препаратів, які б відповідали Європейській фармакопеї (ЄФ) [13]. Насамперед це стосується препаратів панкреатину, для яких у теперішній час відсутні методики визначення ліполітичної активності, хоча згідно з ЄФ таке випробування є обов'язковим для даних препаратів [6].

У вітчизняній фармацевтичній галузі для визначення ліполітичної активності препаратів (наприклад, нігедази [2]) (слід зазначити, що фармакопейного методу визначення ліполітичної активності для панкреатину не існує) в нашій країні використовується метод прямого алкаліметричного титрування жирних кислот, які утворилися в результаті ферментативної реакції протягом певного часу за стандартних умов. Існуючий метод при певній акуратності проведення має порівняно високу точність та відтворюваність, але й ряд істотних недоліків. Це вимагає високої точності приготування та титрування дослідів (враховуючи результати трьох дослідів); дослідження триває протягом дуже довгого часу — (з приготуванням реактивів та інкубуванням близько 3 годин). Спосіб вимагає великої кількості лабораторного посуду. В цілому метод трудомісткий, не експресний, в певній мірі архаїчний, він не враховує різницю онкотичної буферної ємкості визначаємих препаратів, що може привести до помилкового визначення їх активності.

В цілому існує велика кількість різноманітних методів, запропонованих для визначення ліполітичної активності. Це методи, засновані на використанні хромогенних субстратів або субстратів, продукти розкладу яких визначають за допомогою фотоелектроколориметра [16], спектрофотометра [6, 7, 8, 9, 10], або флуоресцентних субстратів [15]; методи, засновані на використанні специфічних систем для проведення ферментативної реакції [11]; імуноферментні методи [12]; методи з використанням моношару субстрату [14] та ін. Але застосування цих методів у практиці фармацевтичного аналізу досить сумнівне, т.я. більшість з них вимагає застосування специфічного обладнання та реактивів або не забезпечує потрібну швидкість та одночасно точність і відтворюваність результатів.

В зв'язку з цим метою даної роботи є розробка методу визначення ліполітичної активності препарату "Панкреатин".

Матеріали та методи

Для приготування субстрату суміш з 16 мл маслинової олії, 14 мл розчину полівінілового спирту та 0,15 мл твіну-80 перемішують у мішалці при 1000 об/хв протягом 10 хв. Для готування субстрату 7 мл отриманої емульсії розводять водою очищеною до 100 мл. Перед використанням його термостатують при 37°С не менше 10 хвилин до стабілізації температури.

Для приготування суспензії панкреатину в охолоджену до 4±3°С ступку вносять відповідну наважку панкреатину і додають 1 мл 0,1 М трис-буфера із pH=7,4-9,0 і температурою не вище 4±3°С. Розтирають до одержання суспензії. Кількісно переносять у мірну колбу на 50,00 мл і доводять охолодженою до 4±3°С водою очищеною до мітки. Розчин зберігають при температурі не вище 4°С. Розчин стандарту ферментного препарату готують аналогічно.

П.С.Янченко — аспірант кафедри фармакогнозії Національної фармацевтичної академії України (м. Харків)

Таблиця 1

Визначення ліполітичної активності панкреатину для обчислення статистичних характеристик при часі дослідження 5 хв. та 5 дослідах

№ п/п	Дослід		Контроль		Визначена активність, УЛО
	об'єм титранту, мл	швидкість витрати титранту, $V_{досл}$, мл/хв	об'єм титранту, мл	швидкість витрати титранту, $V_{ст}$, мл/хв	
1	0,50	0,100	0,51	0,102	980,4
2	0,49	0,098	0,48	0,096	1020,8
3	0,49	0,098	0,50	0,100	980,0
4	0,48	0,096	0,50	0,100	960,0
5	0,52	0,104	0,50	0,100	1040,0

Таблиця 2

Визначення ліполітичної активності панкреатину для обчислення статистичних характеристик при часі дослідження 10 хв. та 3 дослідах

№ п/п	Дослід		Контроль		Визначена активність, УЛО
	об'єм титранту, мл	швидкість витрати титранту, $V_{досл}$, мл/хв	об'єм титранту, мл	швидкість витрати титранту, $V_{ст}$, мл/хв	
1	1,10	0,110	1,06	0,106	1037,7
2	1,07	0,107	1,09	0,109	981,7
3	1,06	0,106	1,08	0,108	981,5

Для проведення досліду необхідна склянка для титрування об'ємом не менше 50 мл, потенціометр з електронною шкалою pH з ціною не менш 0,02 або широкошкальний аналоговий з магнітною мішалкою та з можливістю підтримки температури реакційного середовища 37±1°С, з каломельними електродами. Мікробюретка з ціною розподілу не більше 0,01 мл.

Визначення. У склянку для визначення вносять 30 мл субстрату — емульсії маслинової олії, яка має температуру 37±1°С, і доводять pH середовища до значення 9,2, додаючи 0,1 н розчин натрію гідроксиду при постійному перемішуванні. Потім додають аліквоту 1,0 мл суспензії панкреатину (перед додаванням суспензію ретельно збовтують) і вичікують протягом години, за яку pH реакційного середовища досягне значення 9,0. Потім вмикають хронометр і додають з мікробюретки 0,1 н розчин натрію гідроксиду так, щоб показник pH реакційного середовища підтримувався на значенні 9,0. Фіксують об'єм розчину натрію гідроксиду 0,1 н, витраченого за певний час (5-10 хв). Розраховують швидкість витрати розчину натрію гідроксиду $V_{досл.}$ у мл/хв.

Аналогічно визначають швидкість витрати розчину натрію гідроксиду для досліду зі стандартним препаратом (з відомою активністю) $V_{ст}$.

Результати та їх обговорення

Метод, розроблений на основі методу pH-статування [1], полягає в підтримці певного значення pH в системі фермент — субстрат протягом певного часу та порівняння значення швидкостей ферментативної реакції (пропорційних швидкості витрачання титранту) у досліджуваній та стандартній пробах.

Основні метрологічні характеристики розробленого методу були досліджені на препараті "Панкреатин", що відповідав вимогам НТД [4].

Нами запропонований наступний розрахунок ліполітичної активності панкреатину. Активність препарату розраховується за формулою:

$$A = \frac{V_{ДОСЛ}}{V_{СТ}} \times \frac{m_{СТ}}{m_{ДОСЛ}} \times A_{СТ},$$

де: $V_{досл}$ — швидкість витрати розчину натрію гідроксиду в до-

Таблиця 3

Метрологічні характеристики методу визначення ліполітичної активності при різному часі вимірювання та різній кількості дослідів

Шифр*	μ, УЛО	f	$X_{сер}$	S^2	S	P	$t_{P,f}$	ΔX	E, %	$t_{розр}$	δ
5/5	1000	4	996,2	1104,6	33,2	95%	2,78	18,5	1,9	0,6	0
10/3	1000	2	1000,3	1051,8	32,4		4,30	27,9	2,8	0,04	0

* Шифр означає час одного досліду та кількість дослідів відповідно.

сліді з вивчаємим препаратом, мл/хв;

$V_{ст}$ — швидкість витрати розчину натрію гідроксиду в досліді зі стандартною субстанцією, мл/хв;

$m_{досл}$ — маса наважки досліджуваного препарату, г;

$m_{ст}$ — маса наважки стандартного препарату, г;

$A_{ст}$ — активність стандартного препарату, ЛО.

Активність препарату розраховують, використовуючи середнє з трьох незалежних визначень досліджуваного і стандартного зразків.

Для розробленого методу ми провели статистичний аналіз за методикою ДФ XI [4]. Час, протягом якого вимірювали витрати титранту, становив у першому досліді 5 хв. і у другому досліді — 10 хв. Отримані дані наведені у табл. 1 та 2 відповідно.

При статистичній обробці даних вибірок отримані наступні результати, представлені в табл. 3.

Значення розрахованого критерію Ст'юдента $t_{розр}<t_{P,f}$ свідчить про відсутність з імовірністю P у методу систематичної помилки d. Значення e — відносна похибка методу достатньо малі.

Для порівняння відтворюваності методу в залежності від кількості визначень та часу вимірювання розраховували критерій Фішера F за формулою:

$$F=\frac{S_1^2}{S_2^2}=\frac{1104,6}{1051,6}=1,05$$

Табличне значення F (P, f1, f2) з P=99% дорівнює 99,30. Так як F<F (P, f_1, f_2), ми можемо зробити висновок про однакову відтворюваність методу в даних варіаціях (дані не дозволяють виділити одну з модифікацій як більш відтворювану).

Таким чином, розроблений метод має відносну похибку не більше 2% при проведенні 5 визначень по 5 хвилин та не більше 3% при проведенні 3 вимірів по 10 хвилин, не має систематичної помилки. Метод не потребує спеціфічного обладнання, досить простий у виконанні, може бути легко адаптований для багатьох ліполітичних ферментів.

ВИСНОВКИ

1. Розроблений метод визначення ліполітичної активності препарату "Панкреатин", який полягає в безперервному титруванні середовища ліполітичної реакції з підтримкою певного значення pH за допомогою потенціометра.

2. Відносна похибка визначення ліполітичної активності за розробленим методом не перевищує 2%.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Брокергоф Х., Дженсен Р. Липолитические ферменты / Пер. с англ. — М.: Мир, 1978. — 396 с.*
2. *ВФС 42 — 82 — 93. Нигедаза. — 4 с.*
3. *ВФС 42 — 2299 — 94. Панкреатин медицинский. — 8 с.*
4. *Государственная фармакопея СССР. Издание XI. В 2-х томах. — М.: Медицина, 1987. — 732 с.*
5. *Наказ Держкоммедбіопрому від 19 листопада 1996 р. №117 "Про визнання міжнародних та європейських стандартів ISO 9000 та EN 45000 правил GMP" //Юридические аспекты фармацевтического и медицинского бизнеса (спецвыпуск журнала "Провизор"). — 1998. — С. 63.*
6. *Пат. 0101046 А1 Европа, МКИ^3 С 12 Q 1/44, С 12 N 9/20/LiMuti C.M., Mauck J.C., Babb B.E. (США); Eastman Kodak Comp. — №83107827.4. — Заявл.: 09.08.83. Опубл.: 22.02.84. — 5 с.*
7. *Пат. 19733309 Германия, МКИ^6 С 12 Q 1/14 / Schellong L., Zielenski R.; Boehringer Mannheim GmbH. — №197333095. — Заявл.: 1.08.97. Опубл.: 26.03.98. — 3с.*
8. *Пат. 3986930 США, МКИ^2 С12 К 1/04, НКИ 195/103.5 R./Kurooka S., Hashimoto M., Tomita M., Maki A. (Япония); Dainippon Pharmaceutical. — №579910. — Заявл.: 22.05.75. Опубл.: 19.10.76; — 12 с.*
9. *Пат. 4279994 США, МКИ^3 С12 Q 1/44 НКИ 435/19; 435/184./Cleo I., Huang, Carmel, Ind.; The Dow Chem. Company. — №57525. — Заявл.: 13.07.79. Опубл.: 21.07.81. — 5 с.*
10. *Пат. 4412951 США, МКИ^3 С 07 С 107/08 НКИ 260/202./Inagaki Y., Okazaki M., Fujita S. (Япония); Fuji Photo Film Co., Ltd. — №316025. — Заявл.: 28.10.81. Опубл.: 1.11.83. — 8 с.*
11. *Пат. 5378609 США, МКИ^{6}С 12 Q 1/34. НКИ 435/18./Shing F. Kwan, Rebecca J. Hunt (США); Ivan E. Modrovich. — №693856. — Заявл.: 29.04.1991. Опубл.: 16.01.95. — 16 с.*
12. *Aoubala Mustapha, Ivanova Margarita, Douchet Isabelle et al. //Biochemistry. — 1995. — Vol. 34, №34. — С. 10786-10793.*
13. *European Pharmacopoeia. 3 Ed. — Ver. 4.5 (Vol. 1997, Vol. 1998). — CD-Europe, 1998.*
14. *Nitsch W., Maksymiv R., Erdmann H. //J. Colloid. and Interface Sci. — 1991. — Vol. 141, №2. — С. 322-328.*
15. *Shimura S., Tsuzuki W., Suzuki T. //Anal. Sci. — 1991. — Vol. 7, №1. — С. 15-18.*
16. *Versaw W. K., Cuppett S. //J. Food Sci. — 1989. — Vol. 54, №6. — С. 1557-1558.*

Адреса для листування: 61002, м. Харків
вул. Пушкінська, 53. Тел. (0572) 45-00-86.
Національна фармацевтична академія України

Надійшла до редакції 19.09.2001 р.