

Рекомендована д. біол. наук, проф. Л. С. Фірою

УДК 615.322:615.014.24:615.246.4

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ СЕНОЗИДІВ У КРАПЛЯХ СКЛАДНИХ «ПІКОСЕН»

© В. К. Яковенко, В. А. Георгіянец, І. А. Вишневський

Національний фармацевтичний університет, Харків

Резюме: розроблено методику кількісного визначення сенозидів у складі препарату «Пікосен», краплі оральні, методом абсорбційної спектрофотометрії. Проведено валідацію розробленої методики та визначено основні валідаційні характеристики: специфічність, правильність та прецизійність, лінійність, робастність. Методика характеризується достатньою чутливістю та простотою виконання. Результати досліджень використано при розробці методів контролю якості препарату «Пікосен», краплі оральні.

Ключові слова: кількісний аналіз, спектрофотометрія, сенозиди, валідаційні характеристики.

Вступ. В асортименті лікарських засобів для лікування запорів значне місце посідають препарати рослинного походження. Листя сени, кора крушини, коріння ревеню містять похідні антрацену, а саме похідні емодину, які посилюють перистальтику товстої кишки і мають проносну дію. У свіжозібраній сировині зазвичай містяться відновлені форми антраглікозидів, у висушеній – окиснені, часто в рослинній сировині присутні обидві форми. Антраценпохідні містять групи С=О, –ОН, С=C, а також хіноїдний цикл, що обумовлює їх слабку кислотність, здатність вступати в реакції комплексоутворення, приєднання, окиснення, відновлення, люмінесценції та поглинання при різних довжинах хвиль. Ці властивості покладено в основу більшості методів аналізу. Для виявлення антрахінонів у рослинній сировині відповідно до ДФ СРСР XI видання та ДФУ використовують реакцію з лугом або сублимацію, хроматографію в тонкому шарі сорбента. Застосування хроматографічних систем для якісної і кількісної характеристики зумовлене різною розчинністю і полярністю агліконів та їх глікозидів у безводних органічних розчинниках. Більшість методів кількісного визначення антраценпохідних базується на проведенні попереднього гідролізу антраглікозидів та визначенні суми вільних оксіантрахінонів [2, 3, 5, 8].

Розроблено складні краплі проносної дії на основі синтетичної субстанції та рослинного екстракту. 1 мл препарату «Пікосен» містить натрію пікосульфату 7,5 мг, сени листя екстракту сухого 10 мг, як допоміжні речовини – сорбіт, натрію метилпарагідроксибензоат та воду очищену.

Мета роботи – розробка методики кількісного визначення гідроксиантраценових глікозидів у краплях складних «Пікосен» та її валідація.

Методи дослідження. Об'єкти дослідження – складні оральні краплі «Пікосен», які містять гідроксиантраценові глікозиди сени.

Визначення гідроксиантраценових глікозидів проводили методом абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій і видимій ділянках (ДФУ, 2.2.25 ^М) [3]. Вимірювання проводили на спектрофотометрі Varian Cary 50, реактиви які використовували, мають клас чистоти «фармакопейний» або «чистий для аналізу».

Проведення прободготовки. Випробовуваний розчин (а): 10 мл препарату поміщали в мірну колбу місткістю 100 мл, додавали близько 80 мл води Р, перемішували і доводили водою Р до мітки. 10 мл отриманого розчину поміщали у круглодонну колбу зі шліфом на 100 мл, додавали 20 мл розчину заліза (III) хлориду Р1 і перемішували. Колбу з вмістом нагрівали протягом 20 хв зі зворотним холодильником на киплячій водянній бані з рівнем води, вищим від рівня рідини в колбі, додавали 10 мл кислоти хлористоводневої Р і знову нагрівали протягом наступних 20 хв. Вміст колби охолоджували, кількісно за допомогою 25 мл ефіру Р переносили у ділильну лійку і збовтували протягом 5 хв. Ефірний шар відокремлювали і поміщали в іншу ділильну лійку. Екстрагували ефіром Р ще 2 рази в тих самих умовах. Ефірні екстракти об'єднували у ділильній лійці і промивали двома порціями води Р, по 15 мл кожна. Ефірний шар кількісно переносили у мірну колбу місткістю 100 мл, фільтруючи через паперовий фільтр із 3,0 г натрію сульфату безводного Р, доводили об'єм отриманого розчину ефіром Р до мітки.

Випробовуваний розчин (б): 10 мл випробовуваного розчину (а) поміщали у конічну колбу місткістю 50 мл, випарювали насухо, залишок розчиняли у 10 мл розчину 5 г/л магнію ацетату

Р у метанолі Р при нагріванні на водяній бані з температурою 30 °С протягом 5 хв. Вимірювали оптичну густину випробовуваного розчину (b) і холостого розчину (розчин 5 г/л магнію ацетату Р в метанолі Р) на спектрофотометрі за довжини хвилі 515 нм, використовуючи як компенсаційний розчин метанол Р. Спектри поглинання, одержані при кількісному визначенні гідроксиантраценових глікозидів у препараті «Пікосен», наведено на рисунку 1.

Вміст гідроксиантраценових глікозидів (X_2), у 1 мл препарату, в міліграмах, розраховували за формулою:

$$X_2 = \frac{(A - A_0) \times 100 \times 100 \times 1000}{240 \times 100 \times 10 \times 10} = \frac{(A - A_0) \times 1000}{240},$$

де А – оптична густина випробовуваного розчину (b);

A_0 – оптична густина холостого розчину;

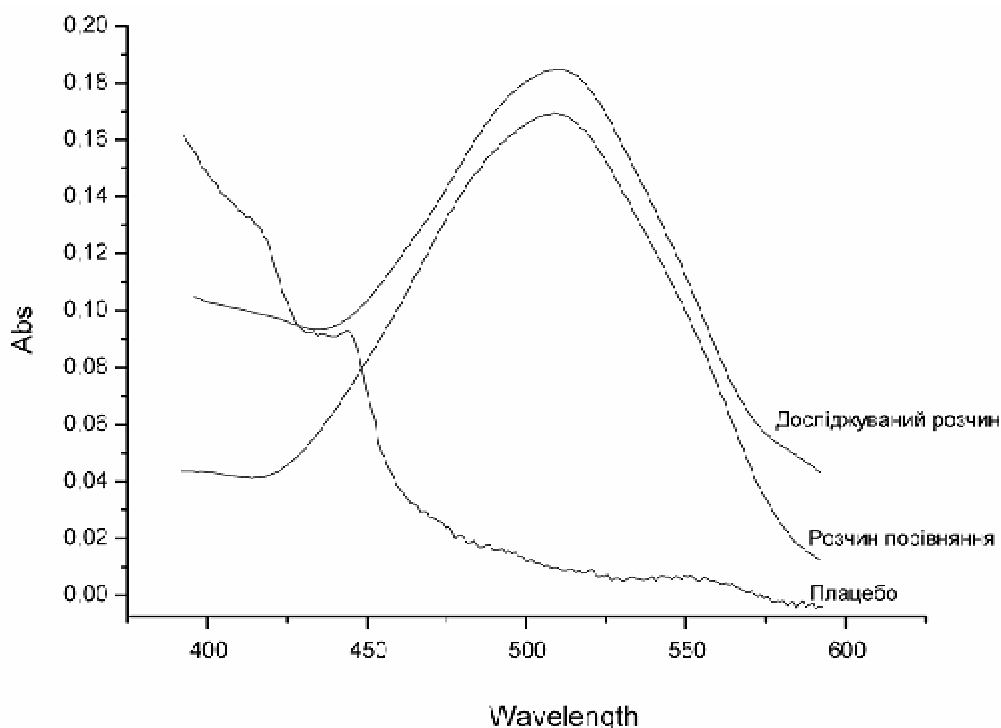


Рис. 1. Спектри поглинання досліджуваних розчинів: 1 – випробовуваний розчин препарату «Пікосен»; 2 – розчин порівняння стандартного зразка сенозиду В; 3 – холостий розчин.

Розрахована невизначеність встановленого питомого показника поглинання становить 1,3 %, невизначеність пробопідготовки 0,88 %, сумарна невизначеність 1,57 %. Отже, використане в процесі аналізу обладнання має забезпечити необхідну точність вимірювань.

Далі проведено валідацію розробленої методики та досліджено її основні валідаційні характеристики, такі, як специфічність, правильність та прецизійність, лінійність, робастність [1, 6, 7, 8].

240 – питомий показник поглинання сенозиду В за довжини хвилі 515 нм.

Вміст гідроксиантраценових глікозидів, у перерахунку на сенозид В, у 1 мл препарату має бути від 0,65 мг до 0,85 мг.

Результати й обговорення. Прогноз невизначеності пробопідготовки і спектрофотометричного вимірювання розраховувався відносно загальних вимог ДФУ до лабораторного обладнання. Відносну невизначеність методики розраховували з огляду на невизначеність встановленого питомого показника поглинання і невизначеності пробопідготовки. При розрахунку невизначеності питомого показника поглинання використовували паспортну (0,15 %), а не максимально допустиму похибка вимірювань спектрофотометра, оскільки встановлення питомого показника поглинання не передбачали в інших аналітичних лабораторіях.

Специфічність. Дослідження специфічності проводиться при валідації випробувань на ідентифікацію, контроль домішок і кількісне визначення. Спосіб підтвердження специфічності залежить від завдань, для розв'язання яких призначено аналітичну методику. При дослідженні на специфічність аналітичний метод повинен забезпечувати ідентифікацію лікарської речовини в присутності інших сполук подібних за хімічною структурою [4, 6].

Специфічність методу кількісного визначення гідроксиантраценових глікозидів у препараті

«Пікосен» доводили шляхом порівняння спектрів досліджуваного розчину і розчину стандартного зразка сенозиду В, приготованих за описаною вище методикою. Отримані спектри мають максимум поглинання за довжини хвилі 515 нм.

Поглинання холостого розчину ($A_{\text{abs}} = 0,00212$) складає 1,12 % від оптичної густини препарату при номінальному вмісті діючої речовини. Отримані результати свідчать, що використовувана методика відповідає вимогам ДФУ, яка допускає відхилення не більше 10 % від ширини вимірюваного діапазону, в експерименті цей показник не перевищив 2,6 % [3].

Правильність та прецизійність. Правильність характеризує ступінь відповідності між відомим справжнім значенням або довідковою величиною і значенням, одержаним за даною методикою. Показником правильності методу зазвичай є значення систематичної похибки. У випадку кількісного визначення речовини в лікарській формі правильність аналітичної методики встановлюється за результатами її застосування до аналізу модельної суміші, яка включає всі компоненти лікарської форми, і відома кількість речовини, яку визначають. Прецизійність аналітичної методики виражає ступінь наближення (або ступінь розкиду) результатів для серії вимірів, виконаних за даною методикою на різних пробах одного і того самого однорідного зразка [1, 6].

Для перевірки правильності методики приготовано 3 окремі суміші з точно відомим вмістом

сенозиду В, які охоплювали діапазон застосування методики (з концентраціями 80, 100, 120 від номінальної). Для кожної модельної суміші проведено 3 паралельні аналізи. Відповідно до ДФУ розраховано такі критерії: систематична похибка δ % (для правильності) і відносний довірчий інтервал Δ_z (для прецизійності) [3]:

$$s_z(\%) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Z_i - \bar{Z})^2}{n-1}} \quad (1)$$

$$\Delta_z = s_z(\%) \cdot t(95\%, n-1) \leq \Delta_{As} \quad (2)$$

$$\delta\% = |\bar{Z} - 100| \leq \frac{\Delta_z}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

де s_z – відносне стандартне відхилення, % (розраховане для відношень «знайдено/введено»);

n – обсяг вибірки;

Δ_z – відносний довірчий інтервал;

Δ_{As} – критичне значення для збіжності результатів;

t – односторонній критерій Стюдента для імовірності 95 % і числа ступенів свободи $n = n - 1$;

δ % – систематична похибка;

Z – знайдений вміст, у % до введеного;

\bar{Z} – середнє значення Z .

Результати вимірювань та проведених розрахунків наведено в таблиці 1.

Таблиця 1. Результати дослідження правильності та прецизійності методики кількісного визначення гідроксиантраценових глікозидів у розробленому препараті

Вміст у модельній суміші, у % до номінального	Оптична густина A_i	Знайдено вміст до номінального, %	Знайдено вміст до введеного, %
80	0,127	79,78	99,72
80	0,129	80,89	101,11
80	0,125	78,67	98,33
100	0,165	100,89	100,89
100	0,161	98,67	98,67
100	0,163	99,78	99,78
120	0,201	120,89	100,74
120	0,198	119,22	99,35
120	0,200	120,33	100,28
Середнє значення Z			99,87
Відносне стандартне відхилення S_z %			0,98
Відносний довірчий інтервал Δ_z			1,81
Критичне значення для збіжності результатів Δ_{As}			< 3,2
Систематична похибка $\delta\%$			0,13
Критерій невизначеності систематичної похибки			< 0,60

Експериментальні результати прецизійності характеризуються припустимим розкиданням відносно середнього і відповідно низьким стандартним відхиленням $S_z \%$ ($S_z \% = 0,98 < 3,2$) на всьому діапазоні концентрацій (80-120 %). Систематична похибка методики становить $\delta \%$ = 0,13, що значно нижче встановленого критерію невизначеності та характеризує достатню близькість середнього результату до його номінального значення.

Лінійність встановлюють на основі результатів досліджень, які пропорційні концентрації речовини, що аналізується, в зразку в межах аналітичної методики $A = k \cdot c + b$.

Для підтвердження лінійності аналітичної методики використовують наступні параметри: коефіцієнт регресії, кут нахилу лінії регресії і залишкова сума площ. Аналітичну ділянку, в межах якої дотримується лінійна залежність, вибирали такою, щоб охоплювала інтервал $\pm 20 \%$ відносно мінімально допустимої межі вмісту речовини, що аналізується (включаючи ці межі), в інтервалі цих меж даний метод забезпечує кількісне визначення з прецизійністю і правильністю, які вимагаються. Поза межами цих діля-

нок відхилення від прецизійності і правильності не матиме вирішального впливу на оцінку якості препарату. Аналітичну ділянку виражали в тих же одиницях, що і результати досліджень, отриманих за допомогою даної методики (%) [4, 6].

Для дослідження лінійності приготовлено 11 розведень препарату з концентраціями від 50 до 150 % від номінального вмісту гідроксиантраценглікозидів у препараті. Розчини готували вазовим способом.

Методика розведення стандартного розчину. 17,5 мг сенозиду В розчиняли в 25 мл води Р. До 10 мл розчину додавали 20 мл розчину заліза (III) хлориду Р1, перемішували і одержували розчин (а). В окремі колби поміщали від 5 до 15 мл розчину (а) з кроком 1 мл, випаровували насухо і розчиняли у 10 мл розчину 5 г/л магнію ацетату Р в метанолі Р при нагріванні на водяній бані з температурою 30 °С протягом 5 хв. Вимірювали оптичну густину випробовуваного розчину (b) і холостого розчину (розчин 5 г/л магнію ацетату Р в метанолі Р) на спектрофотометрі за довжини хвилі 515 нм, використовуючи як компенсаційний розчин метанол Р. Одержані дані оптичної густини і результати їх обробки наведено в таблиці 3 і 4.

Таблиця 3. Результати вивчення лінійності модельних розчинів сенозиду В

Концентрація, мкг/мл	Оптична густина	Концентрація, %	Оптична густина, %
3,85	0,092	51,31	51,24
4,51	0,108	60,08	60,22
5,19	0,126	69,21	69,94
6,08	0,146	81,08	80,86
6,79	0,164	90,56	91,12
7,50	0,180	100,00	100,00
8,21	0,198	109,44	110,14
9,16	0,219	122,16	121,84
9,63	0,234	128,46	129,77
10,60	0,253	141,29	140,58
11,42	0,275	152,31	152,66

Таблиця 4. Параметри лінійності методики кількісного визначення сенозиду В

Назва параметра	Результат	Критерій
Кутовий коефіцієнт лінійної залежності, b	0,99	–
Вільний член лінійної залежності, a	0,236	< 5,1
Коефіцієнт кореляції, r	0,99985	> 0,99236

Графік лінійної регресії наведено на рисунку 2.

Як видно з графіка (рис. 2), вимоги до параметрів лінійної залежності виконують в усьому діапазоні застосування методики (50–150 %).

Робастність методики характеризує стійкість її до незначних змін умов експерименту. Для досліджуваного розчину ми перевірили його стійкість до зберігання, термін зберігання складав 2 го-

дини. Проводили вимірювання оптичної густини досліджуваного розчину протягом всього проміжку часу та порівнювали з початковою. Результати досліджень наведено в таблиці 5.

Таким чином, розраховане відносне стандартне відхилення (RSD) результатів вимірювання оптичної густини становить 1,32, що не перевищує межі абсолютної допустимої похибки.

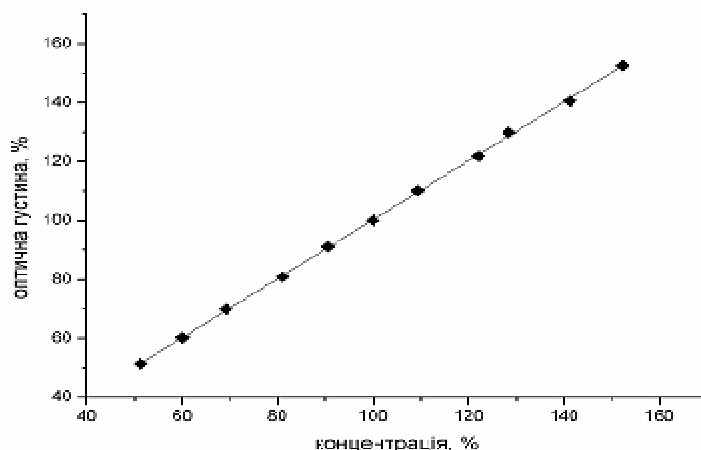


Рис. 2. Графік залежності оптичної густини від концентрації сенозиду В.

Таблиця 5. Результати визначення стабільності досліджуваного розчину

Час зберігання, хв	Концентрація досліджуваного розчину		
	Оптична густина, А	Зміна, %	Різниця, % від початкової
0	0,181	100,00	0,00
15	0,178	98,34	-1,66
30	0,184	101,66	1,66
60	0,180	99,45	-0,55
90	0,183	101,10	1,10
120	0,180	99,45	-0,55
RSD,%	1,32		

Висновки. 1. Доведено можливість застосування спектрофотометричного методу для кількісного визначення гідроксиантраценових глікозидів у складі препарату «Пікосен».

2. Валідаційними дослідженнями підтверджено специфічність, правильність, прецизійність, робастність та лінійність методики кількісного виз-

начення гідроксиантраценових глікозидів у препараті «Пікосен» в діапазоні 50–150 % від номінального вмісту.

3. Отримані результати використано при розробці методів контролю якості лікарського препарату «Пікосен», краплі оральні.

Література

- Гризодуб А. И. Валідация спектрофотометрических методик количественного анализа лекарственных средств в соответствии с требованиями ГФУ / А. И. Гризодуб // Фармаком. – 2002. – №3. – С. 42–50.
- Государственная фармакопея СССР. Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – 11-е изд. – М.: Медицина, 1990. – 399 с.
- Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-ше вид. – Х.: ПІРЕГ, 2001. – 556 с.
- Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / В. Л. Багиров, А. И. Гризодуб, Т. Х. Чибиляев [и др.]. – М., 2007. – 48 с.
- European Pharmacopoeia. – 4th ed. – Strasbourg: Council of Europe, 2001. – 2416 p.
- McB. (Eds.) Method validation in pharmaceutical analysis / J. Ermer, J. H. Miller. Germany: 1st Ed., Wiley-VCH Pub., 2005.
- US FDA. Guidance for Industry Process Validation: General Principles and Practices // U.S. Department of Health and Human Services FDA, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), Center for Veterinary Evaluation and Research Medicine (CVM) – 2011. – 22 p.
- United States Pharmacopoeia 30 / National Formulary 25 (2007) United States Pharmacopoeia Convention. Rockville. – 2007.

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЕННОЗИДОВ В СЛОЖНЫХ КАПЛЯХ «ПИКОСЕН»

В. К. Яковенко, В. А. Георгиянц, И. А. Вишневский

Национальный фармацевтический университет, Харьков

Резюме: разработана методика количественного определения сеннозидов в составе препарата «Пикосен», капли оральные, методом абсорбционной спектрофотометрии. Проведена валидация разработанной методики и определены основные валидационные характеристики: специфичность, правильность и прецизионность, линейность, робастность. Методика характеризуется достаточной чувствительностью и простотой выполнения. Результаты исследований использованы при разработке методов контроля качества препарата «Пикосен», капли оральные.

Ключевые слова: количественный анализ, спектрофотометрия, сеннозиды, валидационные характеристики.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF SENNOSIDES IN THE COMPLEX DROPS «PICOSEN»

V. K. Iakovenko, V. A. Heorhiyants, I. A. Vyshnevskyi

National University of Pharmacy, Kharkiv

Summary: the method of quantitative determination of sennosides in the complex drug «Picosen», oral drops, was created by the absorptive spectrophotometry. The validation of created method was carried out and the basic validative parameters were determined, such as specificity, accuracy, precision, linearity and robustness. This method is characterized by sufficient sensitivity and simplicity of performing. Results of the research were used while method developing of quality control of «Picosen», oral drops.

Key words: quantitative analysis, spectrophotometry, sennosides, validation parameters.