

УДК 615.22:615.453.6:54.062:543.42

М. В. РОСАДА, Н. Ю. БЕВЗ, В. А. ГЕОРГІЯНЦ

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ТАБЛЕТОК З РИБОКСИНОМ

Розроблена методика кількісного визначення рибоксину в препараті з використанням методу спектрофотометрії. Вивчені валідаційні характеристики з використанням критеріїв прийнятності для допусків вмісту $\pm 5,0\%$ підтверджують специфічність, лінійність, прецизійність (збіжність), правильність, діапазон застосування та внутрішньолабораторну прецизійність запропонованої методики.

Ключові слова: стандартизація, рибоксин, таблетки.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ

Згідно статистичних даних ВОЗ захворювання серцево-судинної системи являються основною причиною смертності у всьому світі. Україна займає перше місце у цій сумній статистиці. Рибоксин широко використовується у медичній практиці для лікування захворювань серця: ішемічної хвороби, інфаркту міокарда, кардіоміопатії, порушенні ритму серця, а також при захворюваннях печінки (гепатитах, цирозі та ін.) [5].

Створення вітчизняного препарату для лікування серцево-судинної системи, а також захворювання печінки на основі субстанції рибоксину робить актуальним розробку методів його контролю якості.

АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

Субстанція рибоксину описана в Китайській фармакопеї [8] та фармакопеї РФ [9], її якість відповідає вимогам фірми «Starlake Bioscience Co», Китай [7]. У зв'язку з відсутністю монографії у ДФУ на субстанцію рибоксин, вона контролюється відповідно до аналітичної нормативної документації (АНД) вхідного контролю, яка складена згідно з вимогами фірми виробника. Структурна формула рибоксину – 9- β -рибофуранозилгіпоксантин – наведена на рис. 1.

Препарати на основі інозину широко застосовуються в клініці. Їх випускають такі фірми як

ПрАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця», ПАТ «Київський вітамінний завод», ТОВ «Науково-технологічна фармацевтична фірма «ПОЛІСАН» і ряд інших підприємств, проте потреби фармацевтичного ринку України у вітчизняному рибоксині задовольняються не повністю. Як і раніше існує необхідність у виробництві препаратів на основі інозину, доступних широким верствам населення України. З огляду на ці фактори, розробка препарату «Рибоксин», а також методів його кількісного визначення є актуальною.

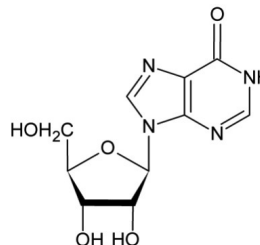


Рис. 1. Структурна формула рибоксину (інозину)

ФОРМУЛЮВАННЯ ЦІЛЕЙ СТАТТІ

Метою нашої роботи є розробка та валідація методики кількісного визначення рибоксину в таблетках методом спектрофотометрії згідно вимог ДФУ [2-4].

ВИКЛАД ОСНОВНОГО МАТЕРІАЛУ

Об'єктом досліджень є таблетки «Рибоксин» з вмістом 200 мг діючої речовини (допоміжні речовини – крохмаль картопляний, цукор-пісок,

гіпромелоза, кроскармелоза натрію, повідон 25, магнію стеарат). Як стандарт використовували стандартний зразок 9- β -D-рибофуранозил гіпоксантин (рибок син (інозин), серія 1 від 20.04.2012 (ФСЗ ДФУ)). Аналітичні дослідження проводили методом спектрофотометрії на спектрофотометрі Specord 205 фірми «Analytik Jena AG» (Германия), з використанням ваг лабораторних електронних OHAUS AP 250D фірми «Ohaus Corporation» (США) та мірного посуду класу А.

За описом досліджувані таблетки – вкриті плівковою оболонкою від світло-жовтого до жовтого кольору, верхня і нижня поверхня яких опуклі. Проведені спектральні дослідження свідчать, що УФ-спектр поглинання 0,001% водного розчину рибоксину в області від 220 нм до 300 нм характеризується максимумом поглинання при довжині хвилі (249 \pm 2) нм. Заміна розчинника на кислий (рН 1,2 або 4,5) або слабко лужний (рН 6,8) не змінює характер

спектра поглинання і максимуми спостерігаються за тієї довжини хвилі (рис. 2).

Тому кількісний вміст рибоксину у таблетках нами рекомендовано визначати з використанням як розчинника води з подальшим спектрофотометрируванням при довжині хвилі 249 нм. Збіг максимумів поглинання спектрів випробовуваного розчину та розчину порівняння свідчить про відсутність впливу допоміжних речовин на кількісне визначення рибоксину в таблетках (рис. 3).

Оскільки методика кількісного визначення відповідно до вимог ДФУ [2-4] має бути валідована, нами була проведена валідація методики визначення рибоксину методом спектрофотометрії для включення до аналітичної документації за основними валідаційними характеристиками: специфічність, лінійність, прецизійність (збіжність), правильність, діапазон застосування, внутрішньолабораторна прецизійність.

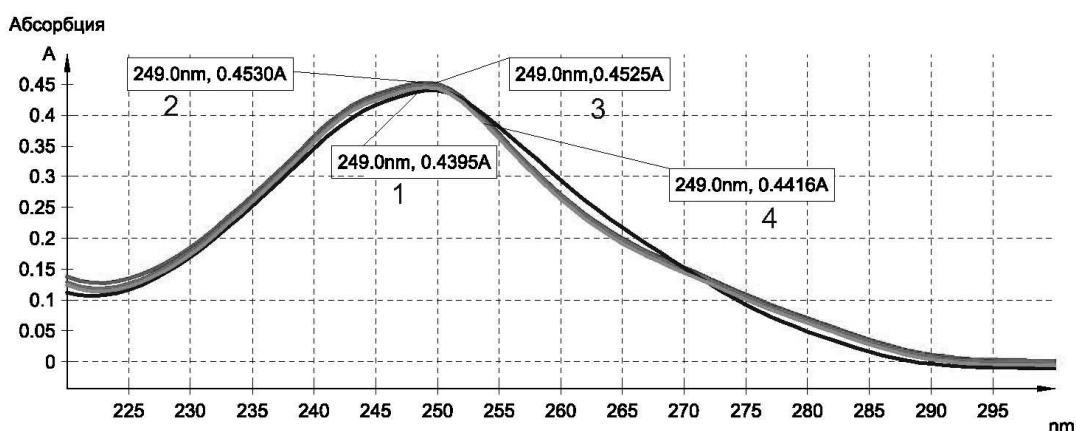


Рис. 2. УФ-спектри 0,001% розчину рибоксину: 1 – у буферному розчині з рН=1,2; 2 – у буферному розчині з рН=4,5; 3 – у буферному розчині з рН=6,8; 4 – у воді

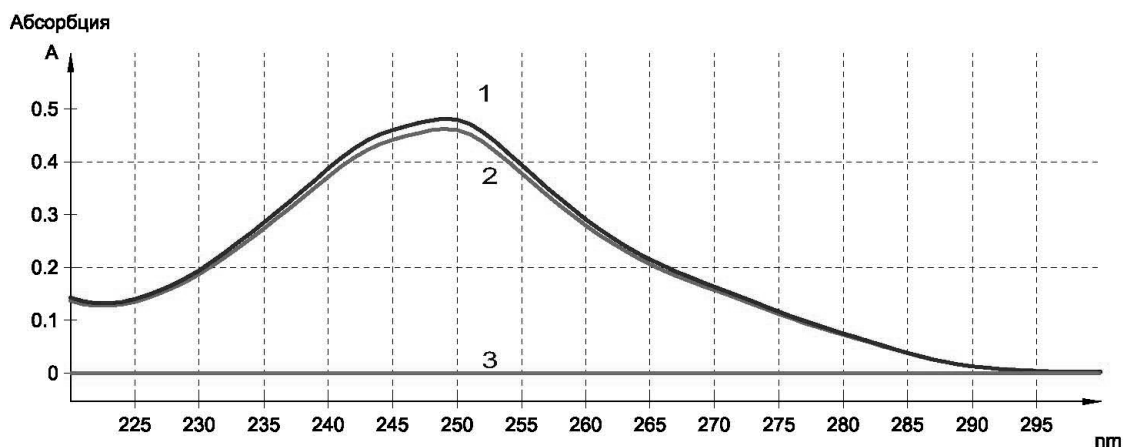


Рис. 3. УФ-спектри: 1 – випробовуваного розчину; 2 – розчину порівняння; 3 – розчину плацебо

Валідації було піддано наступну методику.

Випробовуваний розчин. Наважку порошку розтертих таблеток, еквівалентну 100 мг рибоксину поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 60 мл *води Р*, збовтують протягом 15 хв, доводять об'єм розчину *водою Р* до мітки, перемішують і фільтрують через паперовий фільтр «синя стрічка», відкидаючи перші 20 мл фільтрату; 1 мл одержаного фільтрату поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, доводять об'єм розчину *водою Р* до мітки і перемішують.

Розчин порівняння: 100 мг ФСЗ рибоксину поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 60 мл *води Р*, збовтують протягом 10 хв до розчинення, доводять об'єм розчину *водою Р* до мітки і перемішують; 1,0 мл одержаного розчину поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, доводять об'єм розчину *водою Р* до мітки і перемішують.

Вимірюють оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння на спектрофотометрі за довжини хвилі 249 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи як компенсаційний розчин *воду Р*.

Допуски вмісту (В) рибоксину в готовій лікарській формі під час зберігання складають $\pm 5,0$ %, тому при проведенні валідації критеріями оцінки цієї методики були параметри для $V = 5,0$ %, тобто максимальна невизначеність аналізу (Δ_{As}) має бути не більше 1,6 % [1, 4, 6].

Специфічність методики підтверджується відсутністю впливу фонового поглинання і незначною відносною систематичною похибкою (δ_{noise} (%), яка вноситься допоміжними речовинами і можливими продуктами розкладання і становить 0,11% (рис. 3).

Лінійність, збіжність, правильність і діапазон застосування методики визначали на модельних сумішах з відомим вмістом діючої речовини в межах від 80 до 120 % відносно номінального значення. Розчин порівняння та модельні розчини готувалися по одній і тій самій схемі, фактичні величини X_i із співвідношення $X = C_i / C_{st} \cdot 100$ % були рівні відношенню фактичних наважок субстанції рибоксину, які взяли для приготування даного модельного розчину і розчину порівняння. Робоча концентрація випробовуваного розчину і розчину порівняння близько 10 мкг/мл. Встановлена лінійність залежності оптичної густини розчинів рибоксину від концентрації в області приблизно від 8 мкг/мл до 16 мкг/мл ($\pm 12\%$). На рис. 4 наведена лінійна залежність оптичної густини від концентрації рибоксину в нормалізованих координатах.

Методом найменших квадратів (за даними табл. 2) проведено розрахунок параметрів лінійної залежності $Y_i = b \cdot X_i + a$ для рибоксину (табл. 1).

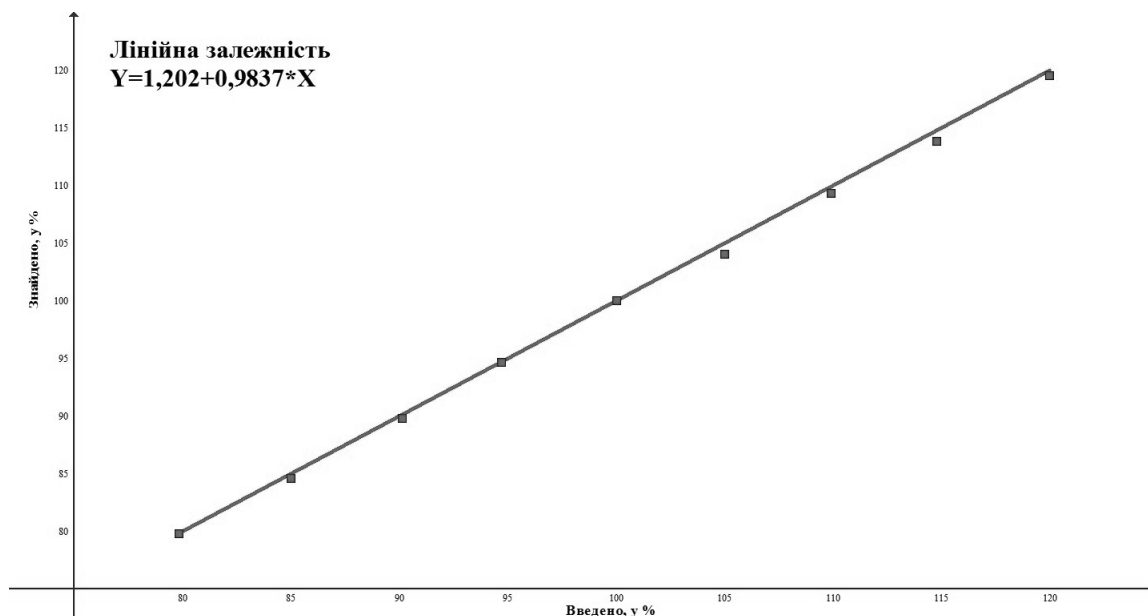


Рис. 4. Лінійна залежність оптичної густини від концентрації рибоксину в нормалізованих координатах

Таблиця 1
**МЕТРОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ
ЛІНІЙНОЇ ЗАЛЕЖНОСТІ ДЛЯ РИБОКСИНУ**

Величина	Значення	Критерій (для допусків 95 – 105 %, $g=9$)	Висновок
b	0,9837	—	—
S_b	0,0083	—	—
a	1,20	1. $\leq 1.8946 \cdot S_a$ = 1,5839, 2. якщо не ви- конується 1), то $\leq 2,6$	Відповідає
S_a	0,84	—	—
S_r	0,32	$\geq 0,84$	—
r	0,9998	$\geq 0,9981$	Відповідає

Як видно з табл. 1, виконуються всі вимоги до параметрів лінійної залежності, тобто лінійність методики визначення рибоксину підтверджується у всьому діапазоні концентрацій (80-120 %). Високе значення коефіцієнту кореляції для рибоксину $r = 0,9998$, також задовольняє вимогам критерію прийнятності ($r = 0,9981$) і підтверджує лінійність залежності між «введеною» і «знайденою» кількістю досліджуваної речовини (табл. 1).

Для рибоксину спектрофотометрична методика аналізу характеризується достатньою прецизійністю (збіжністю), так як знайдене значення відносного довірчого інтервалу величини Z

(0,63) менше критичного значення для збіжності результатів (1,6 %) (табл. 2).

Виконується критерій незначущості систематичної похибки методики – систематична похибка методики (0,41) є практично незначущою, тобто методика аналізу характеризується достатньою правильністю в усьому діапазоні концентрацій від 80 до 120 % (табл. 2).

Дослідження внутрішньолабораторної прецизійності проводили на 5 пробах однієї серії препарату, різними аналітиками, в різні дні (3 дні), з використанням різного мірного посуду, шляхом оцінки значення відносного довірчого інтервалу, яке має бути менше максимально припустимої невизначеності результатів аналізу: $\Delta \bar{Z} \leq 1,6$ (при $V = 5$ %).

Внутрішньолабораторна прецизійність результатів аналізу підтверджена тим, що величина відносного довірчого інтервалу для п'яти паралельних визначень однієї серії препарату ($\Delta \bar{Z} = 0,82$ %) задовольняє критерію прийнятності ($\leq 1,6$ %) (табл. 3).

Прогнозуєма повна невизначеність результатів аналізу не має перевищувати максимально припустиму невизначеність результатів аналізу для допусків вмісту $\pm 5,0$ % складає $\max \Delta_{As} \leq 1,6$ %. Розрахунок Δ_{As} , % проводили з урахуванням невизначеності пробопідготовки та невизначеності кінцевої аналітичної операції (вимірювання):

Таблиця 2

**РЕЗУЛЬТАТИ АНАЛІЗУ МОДЕЛЬНИХ СУМІШЕЙ І ЇХ СТАТИСТИЧНА
ОБРОБКА ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ РИБОКСИНУ**

№ модельного розчину	Наважка ФЗ рибоксину, мг $m_{st} = 100,1$ мг	Введено в % до концентрації розчину порівняння ($X_i = C_i/C_{st}$, %)	Середні значення оптичної густини (A_i) ($A_{st} = 0,4615$)	Знайдено в % до концентрації розчину порівняння ($Y_i = A_i/A_{st}$, %)	Знайдено в % до введеного $Z_i = 100 \cdot (Y_i / X_i)$ %
1	79,9	79,82	0,3683	79,80	99,97
2	85,1	85,01	0,3904	84,59	99,51
3	90,2	90,11	0,4142	89,75	99,60
4	94,8	94,71	0,4369	94,67	99,96
5	100,1	100,00	0,4615	100,00	100,00
6	105,1	105,00	0,4801	104,03	99,08
7	110,0	109,89	0,5044	109,30	99,46
8	114,9	114,79	0,5253	113,82	99,15
9	120,1	119,98	0,5515	119,50	99,60
середнє, \bar{z} %					99,59
Відносне стандартне відхилення, RSDz, %					0,3403
Відносний довірчий інтервал,					0,633
Критичне значення для збіжності результатів ΔA_s , % (гранична невизначеність) 1,6					1,6
Систематична похибка					0,41
Критерій незначущості систематичної похибки ($0,41 \geq 0,211$) якщо не виконується 1), то $\delta \leq 0,32 \times 1,6 = 0,51$ % ($0,211 \leq 0,51$)					Не виконується Виконується
Загальний висновок про точність методики					Коректна

Таблиця 3

РЕЗУЛЬТАТИ ПЕРЕВІРКИ ВНУТРІШНЬОЛАБОРАТОРНОЇ ПРЕЦИЗІЙНОСТІ

№ розчину	Величина Z_z , %		
	1 дослід	2 дослід	3 дослід
1	101,32	102,14	101,66
2	101,98	101,52	101,47
3	101,02	101,69	102,03
4	102,03	101,05	102,01
5	101,45	102,02	101,72
Середнє \bar{Z} (%),	101,56	101,68	101,78
Об'єднане середнє	101,67		
Відносне стандартне відхилення, RSD_z (%),	0,36		
Відносний довірчий інтервал	$1,76 \times 0,36 / \sqrt{5} = 0,26 \leq 1,6$		
Критичне значення збіжності результатів $\Delta_{\Delta z}$, %	1,6		

Таким чином, повна прогнозуема невизначеність результатів для тесту «Кількісне визначення» рибоксину не більше критичного значення $\Delta_{\Delta_{теор}} = 1,6$ %, тобто методика буде давати коректні результати в інших лабораторіях.

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ
ПОДАЛЬШИХ РОЗВІДОК

1. Розроблено методику кількісного визначення рибоксину в таблетках з використанням методу спектрофотометрії в ультрафіолетовій та видимій області для включення до методів контролю якості на готову лікарську форму таблетки «Рибоксин».

2. Проведено процедуру валідації методики кількісного визначення рибоксину, з використанням критеріїв прийнятності для допусків вмісту $\pm 5,0$ %, яка підтверджує специфічність, лінійність, прецизійність (збіжність), правильність, діапазон застосування та внутрішньолабораторну прецизійність запропонованої методики.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ
ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Гризодуб А. И. Стандартные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств / А. И. Гризодуб // Фармаком. — 2006. — №1/2. — С. 3–44.

2. Гризодуб А.И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств // В кн.: «Аналитическое обеспечение создания, стандартизации и контроля качества лекарственных средств». Под редакцией В.П. Георгиевского. – Х. : «НТМТ». – Т. 1. – 2011. – С. 934-1063.

3. Государственная фармакопея Российской Федерации Часть. 1 / Научный центр экспертизы средств медицинского применения // РИБОКСИН (ФС 42-0275-07) – 2007 – С. 624–627.

4. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: РІРЕГ, 2001. — 556 с.

5. Державна фармакопея України / Державне підприємство Науково-експертний фармакопейний центр. — 1-е вид. — Доп. 1. — Х.: РІРЕГ, 2004. — 494 с.

6. Державна фармакопея України / Державне підприємство Науково-експертний фармакопейний центр. — 1-е вид. — Доп. 2. — Х.: РІРЕГ, 2007. — 617 с.

7. Машковский, М.Д. Лекарственные средства: – 16-е изд. перераб., испр. и доп. / М. Д. Машковский. — М. : Новая волна, 2010. — С. 702.

8. Китайська фармакопея. Vol. 2 / People's Medical Publishing House – 2005. – P. 438–440.

9. Drug master file (for Inosine) / «Starlake Bioscience Co.». – China, 2007. – P. 68.

УДК 615.22:615.453.6:54.062:543.42

Н.В. Росада, Н.Ю. Бевз, В.А. Георгиянц

**РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТАБЛЕТОК С РИБОКСИНОМ**

Разработана методика количественного определения рибоксина в препарате с использованием метода спектрофотометрии. Изученные валидационные характеристики с использованием критериев приемлемости для допусков содержания $\pm 5,0\%$ подтверждают специфичность, линейность, прецизионность (сходимость), правильность, диапазон применения и внутрилабораторную прецизионность.

Ключевые слова: стандартизация, рибоксин, таблетки.

UDC 615.22:615.453.6:54.062:543.42

N.V. Rosada, N.Yu. Bevz, V.A. Georgiyants

**WORKING OUT AND VALIDATION THE METHOD OF QUANTITATIVE
DETERMINATION OF TABLETS WITH RIBOXINE**

The method of quantitative determination of riboxine of the preparation by the method spectrophotometric is developed. Spent validation researches, with use of criteria of an acceptability for maintenance admissions $\pm 5,0\%$, confirm specificity, linearity, precision (repeatability), accuracy, a range of application and intermediate precision the offered method.

Key words: standardization, riboxine, pill.

Адреса для листування:

61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4.

Кафедра фармацевтичної хімії, НФаУ

Тел.: (0572) 67-91-97, 67-91-85

E-mail: pharmchem@nuph.edu.ua

Надійшла до редакції:

21.09.2015 р.