

УДК 615.074

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

*Національний фармацевтичний університет*

## ВАЛІДАЦІЯ ВЕРХ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ТАУРИНУ В КОМБІНОВАНОМУ ЛІКАРСЬКОМУ ЗАСОБІ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ДІАБЕТИЧНИХ УСКЛАДНЕНЬ

*Розроблена методика кількісного визначення таурину в новому комбінованому лікарському засобі методом високоефективної рідинної хроматографії з попередньою дериватизацією 1-фтор-2,4-дінитробензолом. Проведена валідація розробленої методики. Показано, що валідаційні критерії методики відповідають вимогам Державної фармакопеї України для методик кількісного визначення з допусками змісту активної речовини  $\pm 5\%$ .*

*Ключові слова:* високоефективна рідинна хроматографія, таурин, валідація.

### ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ

Одним з механізмів розвитку діабетичних ангіопатій вважають наявність генетичної схильності до аномалії клітинних мембран, що реалізується в судинну патологію через метаболічні порушення. У зв'язку з цим доцільне використання в лікуванні хворих цукровим діабетом (ЦД) лікарських засобів (ЛЗ) мембраностабілізуючої дії. До таких ЛЗ відноситься таурин. Він допомагає стабілізувати рівень цукру в крові при 1 та 2 типах ЦД. У пацієнтів з діабетом 2 типу таурин підвищує чутливість кліток до інсуліну, а при діабеті 1 типу щоденний прийом препаратів на його основі призводить до довготривалого зниження рівня цукру в крові і до зменшення аномальної активності тромбоцитів. У хворих на ЦД концентрація таурину в крові часто нижче за норму, що можливо підвищує їх сприйнятливості до ретинопатії та серцевих захворювань [1,6,15,16].

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 таурину містить тіоктову кислоту та допоміжні речовини.

### АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

Важливість розробки та впровадження у виробництво ЛЗ для лікування ЦД не підлягає

сумніву, оскільки кількість хворих збільшується кожного року [12,14,16]. Тому, створення нових ефективних комплексних лікарських засобів для лікування ЦД та його ускладнень, що не мають побічних ефектів, є актуальною проблемою сучасної фармації [6,7].

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. На сьогоднішній день існує ряд моно- та комбінованих препаратів, що містять таурин. Однак комплексних препаратів, які містять водночас таурин та тіоктову кислоту в одній лікарської формі, в Україні на сьогоднішній день, не зареєстровано і не випускається.

### ВИДІЛЕННЯ НЕ ВИРІШЕНИХ РАНІШЕ ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ

Нами був розроблений склад нового комбінованого ЛЗ для профілактики та лікування діабетичних ускладнень на основі тіоктової кислоти та таурину [8,9,10,11]. Для стандартизації досліджуваного ЛЗ були розроблені та валідовані методи контролю його якості.

Загальноприйнятним способом визначення таурину у ЛЗ, харчових продуктах та ін. є отримання його похідних, оскільки молекула таурину не має хромофорних груп. Зазвичай використовують 1,2-нафтохинон-4-сульфокислоту, 1-фтор-2,4-дінитробензол для детектування у видимій частині спектру, або реагенти, які дозво-

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

ляють вимірювати флуоресценцію отриманого продукту.

При проведенні попередніх досліджень методом спектрофотометрії в ультрафіолетовій та видимій областях було встановлено, що окрім отримання жовтого продукту реакції таурину з 1,2-нафтохинон-4-сульфокислоту спостерігається реакція взаємодії вказаного реагенту з тіоктовою кислотою, що унеможливило використання методу спектрофотометрії для селективного визначення таурину. Для вирішення цієї проблеми був обраний селективний метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з попередньою дериватизацією 1-фтор-2,4-днітробензолом (ДНФБ) на підставі літературних даних [5].

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, провести стандартизовану процедуру валідації аналітичних методик та експериментальні дослідження з вивчення метрологічних характеристик методики.

#### ФОРМУВАННЯ ЦІЛЕЙ СТАТТІ

Метою даного дослідження була адаптація методики ВЕРХ для визначення таурину в новому комбінованому ЛЗ, що містить таурин та тіоктову кислоту, а також її валідація для цілей кількісного визначення за вимогами ДФУ [2].

#### 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 розчини: РСЗ таурину; натрію тетраборат, 1-фтор-2,4-днітробензол, діоксан, метанол, 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 ProntoSIL C18 розміром 125×2 мм, яка заповнена сорбентом с розміром часток 5 мкм;
- рухома фаза: суміш 8 об'ємів 10 мМ фосфатного буферу (рН 6) та 2 об'ємів метанолу;
- детектування за довжини хвилі 360 нм;
- температура колонки 35 °С;
- швидкість елюенту: 0,7 мл/хв;
- об'єм дозування: 10 мкл.

#### Валідація методики

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

*Запасний розчин* таурину в 0,05 М розчині натрію тетраборату концентрацією 2 мг/мл.

*Отримання похідних* здійснювали наступним чином: аліквоту запасного або випробуваного розчину поміщали в мірну колбу місткістю 50 мл, додавали 25 мл 0,05 М розчину натрію тетраборату, 2 мл 10 % розчину 1-фтор-2,4-днітробензолу в діоксані, витримували на водяній бані при температурі 40°С протягом 40 хвилин, охолоджували до кімнатної температури в захищеному від світла місці та доводили об'єм розчину до позначки 50 % метанолом. Розчин перемішували та фільтрували.

*Модельні розчини* готували із запасного за методикою отримання похідних, розмір аліквот становив від 3 мл до 7 мл із шагом 0,5 мл; кінцева концентрація становила 0,12 мг/мл – 0,28 мг/мл.

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

#### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

*Невизначеність прободготовки.* Виходячи з методики приготування розчинів та використання методу високоефективної рідинної хроматографії, повна прогнозована невизначеність методики становить  $1,52 < \Delta_{As} = 1,6$ . Отримані дані свідчать про відсутність впливу прободготовки на результати визначення.

*Специфічність, правильність, збіжність.* Типова хроматограма стандартного розчину (а), випробуваного розчину (б) та розчину «плацебо» (с) наведені на рис. 1.

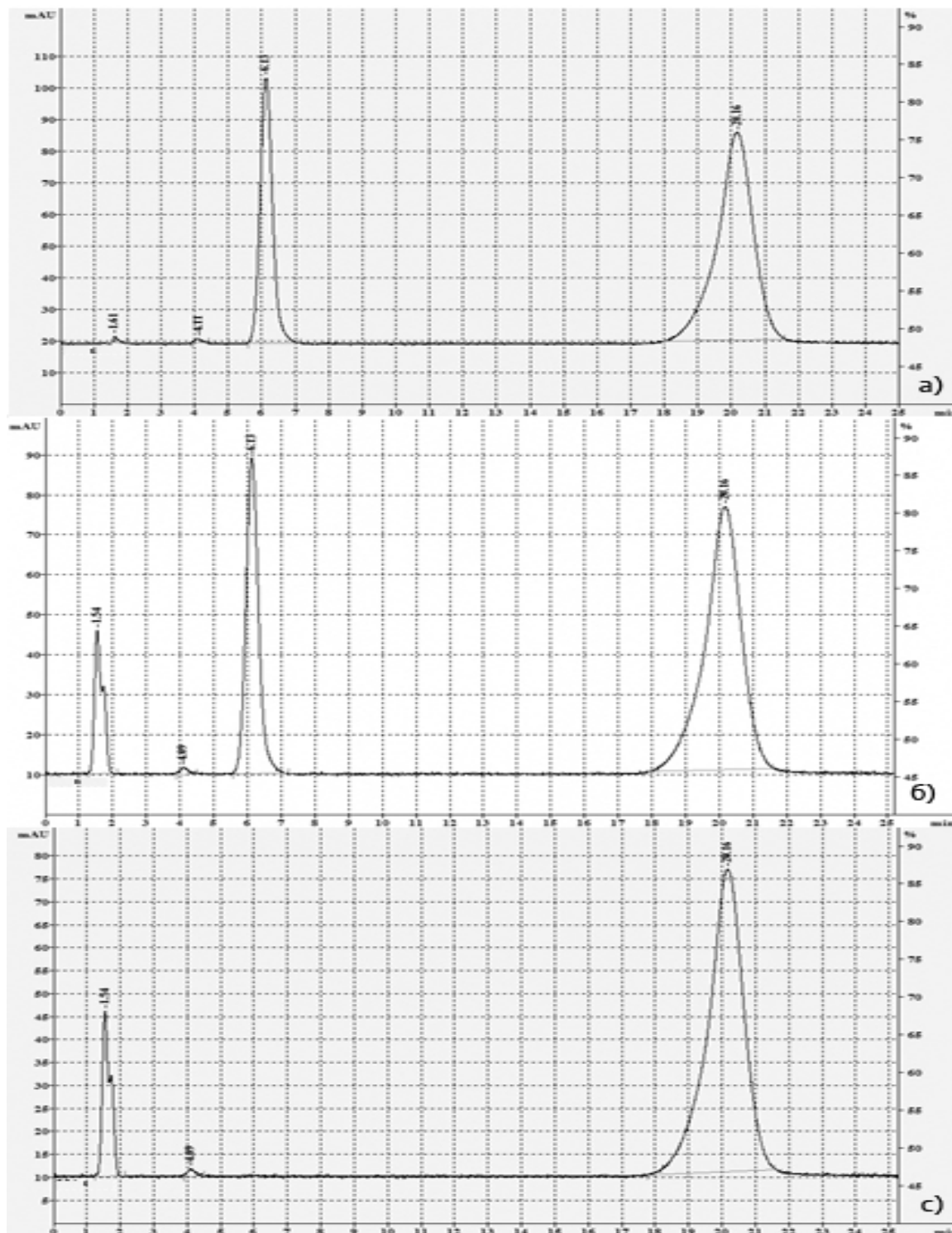


Рис. 1. Типові хроматограми стандартного розчину (а), випробуваного розчину (б) та розчину «плацебо» (с).

Пік ДНФБ-таурину відокремлюється від піку реагенту та системних піків, що вказує на специфічність методики. В таблиці 1 наведено визна-

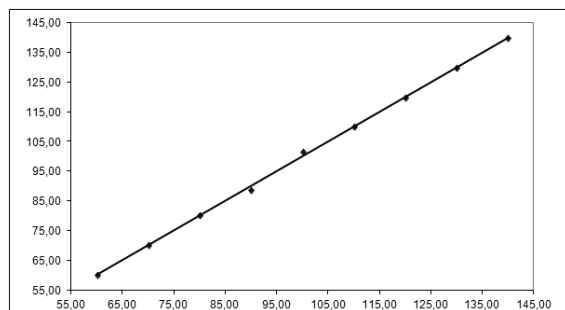
чення валідаційних критеріїв «правильність» та «збіжність».

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

№ модельного розчину	Концентрація модельного розчину, мг/мл	Концентрація в нормалізованих координатах, $X_i$ , %	Середнє значення площ піків	Середнє значення площ піків в нормалізованих координатах, $Y_i$ , %	$Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \times 100\%$
Стандартний розчин	0,2		1544,9028		
1	0,12	60,00	927,5230	60,04	100,06
2	0,14	70,00	1083,9430	70,16	100,23
3	0,16	80,00	1240,0060	80,26	100,33
4	0,18	90,00	1371,3780	88,77	98,63
5	0,2	100,00	1570,2490	101,64	,64
6	0,22	110,00	1697,6660	109,89	99,90
7	0,24	120,00	1848,5250	119,65	99,71
8	0,26	130,00	2005,5260	129,82	99,86
9	0,28	140,00	2159,3090	139,77	99,84
Середнє $Z =$			100,02		
Стандартне відхилення $SD_z =$			0,78		
Довірчий інтервал $\Delta\% = t(95\%; f) \times SD_z =$			1,45	$< \max \Delta_{As} = 1,6$	
Перевірка незначущості систематичної похибки					
Систематична похибка $\delta[Z-100] =$			0,02	$< 0,38$	
				$< 0,51$	

Даними таблиці 1 можна підтвердити виконання критеріїв «правильність» та «збіжність» вимогам ДФУ.

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



**Рис. 2.** Калібрувальна пряма залежності площ піків ДНФБ-таурину в модельних розчинах від її концентрації в них.

В таблиці 2 наведено визначення валідаційних критеріїв «лінійність».

Даними таблиці 2 можна підтвердити 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 від-

творюванні методики в лабораторії: критерій прийнятності  $Z_{intra} = 1,5 < \max \Delta_{As} = 1,6$ .

Таблиця 2

**ВИЗНАЧЕННЯ ВАЛІДАЦІЙНИХ  
КРИТЕРІЇВ «ЛІНІЙНІСТЬ»**

Критичний параметр	Отриманий результат	Максимальне значення
Число ступенів свободи (f)	7	
Коефіцієнт Стюдента ( $t_{(0,95,f)}$ )	2,36	
Кут нахилу ( $b \pm S_b$ )	$0,99 \pm 0,01$	
Вільний член ( $a \pm S_a$ )	$0,4 \pm 1,0$	$< 1,28$
Залишкове стандартне відхилення ( $RSD_0$ )	0,78	$< 0,85$
Коефіцієнт кореляції ( $r_{(x)}$ )	0,99963	$> 0,99945$
Ліміт визначення	3,52	
Ліміт кількісного визначення	10,66	

*Стабільність розчинів* визначали протягом 6 годин. У визначений термін встановлена стабільність розчинів та їх придатність для проведення ВЕРХ аналізу: критерій прийнятності  $0,47 < \max \delta = 0,512$ .

**ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ  
ПОДАЛЬШИХ РОЗВІДОК**

1. Розроблена ВЕРХ-методика з попередньою дериватизацією для кількісного визначення

таурину 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  $\pm 5\%$ .

#### ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Бурова И.И. Гипогликемическое действие таурина / И.И. Бурова, Г.Я. Докшина, Т.И. Шустова // *Воп. мед. химии.* — 1994. — Т. 30, вып. 6. — С. 15-17.
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. Валідація спектрофотометрических методик количественного анализа лекарственных средств в соответствии с требованиями ГФУ / А.И. Гризодуб // *Фармаком.* — 2002. — № 3 — С. 42-50.
4. Стандартизованная процедура валідації методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта / А.И. Гризодуб, Д.А. Леонтьев, Н.В. Денисенко, [та ін.]. // *Фармаком.* — 2004. — № 3 — С. 3-17.
5. Применение метода обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии для разделения смеси и идентификации таурина, карнозина и глутатиона / М. А. Халикова, Д. А. Фадеева, А. А. Зинченко [та ін.]. // *Научные ведомости БелГУ. Серия Медицина. Фармация.* — 2010. — № 22 (93). Выпуск 12. — С. 157-160.
6. Коваленко Св.М. Актуальність створення сучасних препаратів для лікування і профілактики ускладнень цукрового діабету на основі таурину / Св.М. Коваленко // *Український вісник психоневрології.* — 2010. — Т. 18, вип. 2 (63). — С. 85-86.
7. Коваленко Св.М. Обґрунтування актуальності розробки комбінованих лікарських засобів на основі тіоктової кислоти / Св.М. Коваленко // *Мат. Всеукраїнської наук. конфер.* —Х.: Вид-во НФаУ, 2011. — С. 203.
8. Коваленко Св. М. Розробка складу комплексного лікарського препарату у формі таблеток для лікування діабетичних ускладнень / Св.М. Коваленко // *Молодь – медицині майбутнього : міжнар. конф. студентів та молодих вчених – Одеса.* — 2012. — С. 80-81.
9. Коваленко Св.М. Вибір допоміжних речовин при створенні комбінованих таблеток для лікування діабетичних ускладнень / Св. М. Коваленко // *Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології // Збірник наукових праць.* — Вип.1 (109). — Київ-Луганськ. — 2012. — С. 333-340.
10. 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.
11. Коваленко Св.М. Розробка складу комплексного лікарського препарату у формі таблеток для лікування діабетичних ускладнень // *Молодь – медицині майбутнього : міжнар. конф. студентів та молодих вчених.* — Одеса. — 2012. — с. 80-81.
12. Сучасні аспекти пероральної фармакотерапії цукрового діабету 2 типу. / [В. П. Черних, Л. М. Малоштан, Н. І. Горбенко та ін.]. — Х.: «Буркун і К». — 2010. — 205 с.
13. Токмакова А. Ю. Сахарный диабет. / А. Ю. Токмакова, Г. Ю. Страхова, Г. Р. Галстян — М. : — 2005. — № 1.
14. American Diabetes Association: Standards of medical care in diabetes 2008 // *Diabetes Care.* — 2008. — Vol. 31, Suppl. 1. — P. 12-54.
15. Huizinga M. Weight-loss pharmacotherapy: a brief review/ M. Huizinga // *Clinical Diabetes.* — 2007. — Vol. 25, № 4. — P. 135-140.
16. Zimmet P. Global and societal implications of the diabet epidemic / P. Zimmet, K.G.M.M. Alberty, J. Shaw // *Nature.* — 2001. — Vol. 414. — P. 782 – 787.

## **УДК 615.074**

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

### **ВАЛИДАЦИЯ ВЭЖХ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТАУРИНА В КОМБИНИРОВАННОМ ЛЕКАРСТВЕННОМ СРЕДСТВЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ДИАБЕТИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ**

Разработана методика количественного определения таурина в новом комбинированном лекарственном средстве методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с предварительной дериватизацией 1-фтор-2,4-динитробензолом. Проведена валидация разработанной методики. Показано, что валидационные критерии методики соответствуют требованиям Государственной фармакопеи Украины для методик количественного определения с допусками содержания активного вещества  $\pm 5\%$ .

**Ключевые слова:** высокоэффективная жидкостная хроматография, таурин, валидация.

## **UDC 615.074**

**Sv. M. Kovalenko, S. A. Shklyayev, S. N. Kovalenko**

### **HPLC PROCEDURE VALIDATION OF TAURINE DETERMINATION IN THE COMPLEX MEDICINE FOR TREATMENT OF DIABETIC COMPLICATIONS**

The definition procedure of taurine by a high performance liquid chromatography with pre-column derivative with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene in the new complex medicine by was developed 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  $\pm 5\%$ .

**Key words:** high performance liquid chromatography, taurine, validation.

*Адреса для листування:*

08132, Києво-Святошинський район,

м. Вишневе, вул. Київська 6.

Тел./факс: (044)-239-08-99.

E-mail: mail2serg@gmail.com

Надійшла до редакції:

24.08.2012