



Ю.В. Монайкіна, С.О. Васюк, В.В. Гладишев

Розробка та валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення міноксиділу у лікарській формі для зовнішнього застосування

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова:

спектрофотометрія, валідація,
кількісне визначення, міноксиділ,
лікарська форма.

Розроблено нову спектрофотометричну методику кількісного визначення міноксиділу у лікарській формі. Методика ґрунтується на вимірюванні абсорбції розчину препарату у 0,1 М кислоті хлористоводневої за довжини хвилі 281 нм. Проведено процедуру валідації і встановлено, що опрацьована методика відповідає вимогам ДФУ, які висуваються до аналітичних методик кількісного визначення лікарських речовин у складі лікарських форм.

Разработка и валидация спектрофотометрической методики количественного определения миноксидила в лекарственной форме для наружного применения

Ю.В. Монайкіна, С.А. Васюк, В.В. Гладишев

Разработана новая спектрофотометрическая методика количественного определения миноксидила в лекарственной форме. Методика основана на измерении абсорбции раствора препарата в 0,1 М кислоте хлористоводородной при длине волны 281 нм. Выполнена процедура валидации и установлено, что данная методика соответствует требованиям ГФУ, предъявляемым к методикам количественного анализа лекарственных веществ в составе лекарственных форм.

Ключевые слова: спектрофотометрия, валидация, количественное определение, миноксидил, лекарственная форма.

Development and validation of spectrophotometric method for quantitative determination of minoxidil in a dosage form for topical use

J.V. Monaykina, S.O. Vasjuk, V.V. Gladishev

A new spectrophotometric method for the quantitative determination of minoxidil in pharmaceutical substances is developed. The method is based on measurement of absorption of minoxidil solutions in 0,1 M hydrochloric acid at 281 nm. The proposed method is valid according to the validation requirements of Ukrainian Pharmacopeia.

Key words: spectrophotometry, validation, quantitative determination, minoxidil, drug formulation.

Міноксиділ – вискоєфективний лікарський препарат, що використовується для лікування андрогенної алопеції [1]. Асортимент косметичних і лікарських засобів для зовнішнього застосування, до складу яких входить ця лікарська речовина, постійно розширюється, тому актуальним питанням для сучасного фармацевтичного аналізу є вдосконалення існуючих і розробка нових методик контролю якості лікарських форм міноксиділу.

Згідно з Британською Фармакопеєю [2], кількісне визначення міноксиділу у лосьйоні для зовнішнього застосування здійснюють способом неводного титрування з потенціометричним фіксуванням точки кінця титрування. Фармакопея Сполучених Штатів Америки визначає рідинну хроматографію як спосіб кількісного аналізу міноксиділу у лікарських формах [3]. У спеціалізованій літературі також описано методи, що ґрунтуються на використанні капілярного електрофорезу та міцелярної електрокінетичної капілярної хроматографії [4,5]. Відоме визначення міноксиділу у лікарських формах і біологічних рідинах за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії із застосуванням УФ- та мас-спектрометричної детекції [6,7]. Щодо спектрофотометричних методик кількісного аналізу фармацевтичних препаратів міноксиділу, то вони представлені методом фотометричного титрування та проточно-інжекційним

методом на основі редокс-реакції взаємодії міноксиділу з перманганатом калію [8,9]. Потрібно зазначити, що описані у науковій літературі хроматографічні методики кількісного аналізу міноксиділу застосовують лише за наявності дорогого обладнання, спектрофотометричні способи є досить тривалими у виконанні, а у титриметричному аналізі застосовуються токсичні розчинники, стандартизація яких потребує ще й додаткових затрат часу.

Отже, доцільним є звернення до спектрофотометричного визначення цього препарату за власним поглинанням в ультрафіолетовій ділянці спектра як до точного, експресного та доступного методу.

Мета роботи

Розробка та валідація нової спектрофотометричної методики кількісного визначення міноксиділу у лікарській формі для зовнішнього застосування за власним поглинанням.

Матеріали і методи дослідження

Об'єкт дослідження – лікарська форма міноксиділу «Мінох 2» лосьйон для волосся 2% 50 мл (серія 042011, Вельта ЛТД, Україна). У якості розчинника застосовували 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої, у якості стандарту – РСЗ міноксиділу.

Аналітичне обладнання: спектрофотометр Specord 200, ваги електронні АВТ-120-5DM, мірний посуд класу А.

Методика кількісного визначення міноксиділу в 2% лосьйоні для зовнішнього застосування. Точну наважку (0,80–1,20 мл) лосьйону вміщували в мірну колбу ємністю 100,00 мл, доводили до позначки 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої, перемішували. 1,00 мл отриманого розчину переносили в мірну колбу ємністю 25,00 мл та доводили до позначки тим самим розчинником. Абсорбцію вимірювали на фоні розчинника при довжині хвилі 281 нм. Паралельно проводили визначення з 1,00 мл 0,02% розчину порівняння міноксиділу, який готували шляхом розчинення в 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої точної наважки субстанції міноксиділу, що відповідала вимогам АНД. Розрахунок вмісту діючої речовини проводили за типовою формулою.

Результати та їх обговорення

Підбір розчинника для розробки методики кількісного визначення міноксиділу за власним поглинанням здійснювали, керуючись даними про розчинність препарату, а також враховуючи доступність і нетоксичність розчинника. Відповідно до даних спеціалізованої літератури, міноксиділ є малорозчинним у воді, але розчиняється в етанолі, метанолі, пропіленгліколі, а також у кислоті хлористоводневій [1]. Як найдоступніший і нетоксичний розчинник для розробки цієї методики обрано 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої.

УФ-спектр міноксиділу у 0,1 М кислоті хлористоводневій характеризується двома смугами поглинання. Перша смуга спостерігається при 215–245 нм і має максимум поглинання за довжини хвилі 231 нм, друга смуга поглинання знаходиться між 265–295 нм з максимумом поглинання при 281 нм (рис. 1). Найпридатнішою для розробки методики кількісного аналізу міноксиділу визначено саме другу смугу поглинання, оскільки вона знаходиться у селективнішій області спектра і має положітій максимум, що зменшує похибку визначення [10].

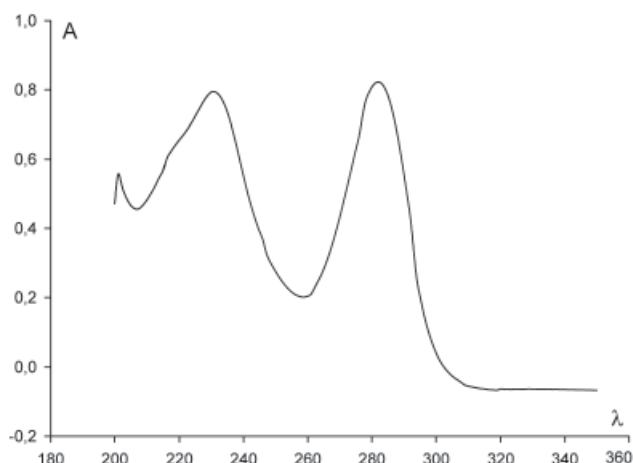


Рис. 1. УФ-спектр поглинання міноксиділу у 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої.

Валідація аналітичної методики. Відповідно до вимог ДФУ проведено валідацію розробленої аналітичної методики згідно із стандартизованою процедурою валідації методик кількісного аналізу лікарських засобів методом стандарту [11,12]. У ході процедури визначено основні

валідаційні характеристики: лінійність, прецизійність, правильність, робастність.

Лінійність і діапазон застосування методики. Лінійність визначено у межах концентрацій, в яких спостерігається підпорядкування закону Бера, зокрема 0,64–0,96 мг/100 мл. Шляхом розведення стандартного 0,02% розчину міноксиділу в 0,1 М кислоті хлористоводневій отримували розчини з відомою концентрацією: 0,80; 0,90; 1,00; 1,10; 1,20 мл стандартного розчину вміщували в колби ємністю 25,00 мл, доводили до позначки тим же розчинником і проводили визначення за наведеною загальною методикою. На основі отриманих даних будували графік залежності абсорбції від концентрації досліджуваної речовини (рис. 2).

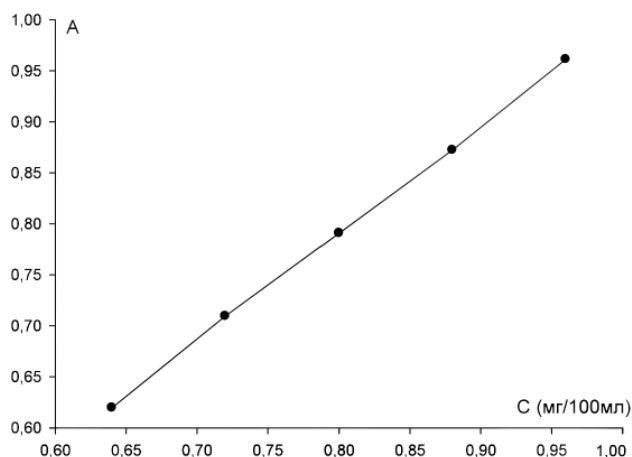


Рис. 2. Графік залежності абсорбції від концентрації міноксиділу.

Шляхом регресійного аналізу методом найменших квадратів знайдено: $y_i = 1,0579 x_i - 0,0556$. Числові показники лінійної залежності: коефіцієнти b , a , стандартні відхилення для b і a – s_b , s_a , залишкове стандартне відхилення $s_{x,0}$ (%) і коефіцієнт кореляції r наведено у таблиці 1.

Таблиця 1

Параметри лінійної залежності

Параметри	Значення
Рівняння регресії	$A=b \cdot X+a$
Кутовий коефіцієнт b	1,0579
Вільний член a	- 0,0556
s_b	0,0115
s_a	0,0093
Коефіцієнт кореляції r ($n=5$)	0,9998
$s_{x,0}$ (%)	0,3427

Виконання нерівності $a \leq \Delta a = t(95\%; 6) \cdot S_a$ ($0,0556 < 0,0219$) доводить відсутність систематичної похибки методу. Коефіцієнт кореляції є показником жорсткості лінійного зв'язку між величинами x та y , тобто чим ближче абсолютна величина $|r|$ до одиниці, тим менш випадкова спостережувана лінійна залежність. Згідно з літературними даними, для аналітичних цілей використовують лінійну залежність з коефіцієнтом кореляції $\geq 0,997$ [13].

Отже, розраховані числові показники свідчать, що

виконуються усі вимоги ДФУ щодо параметрів лінійної залежності, і лінійність методики підтверджується в обраному діапазоні концентрацій (80–120%).

Прецизійність методики визначали на рівні збіжності. Проводили дев'ять паралельних визначень (три наважки досліджуваної лікарської форми, три повтори). Абсорбцію розчину порівнювали вимірювали паралельно. Вміст міноксиділу у лікарській формі у відсотках розраховували за типовою формулою.

Відповідно до вимог ДФУ до прецизійності методик, однієї довірчий інтервал (Δ_x) не має перевищувати максимальну припустиму невизначеність аналізу ($\Delta_{As}\%$), що становить третю частину відносного допуску вмісту аналізованої речовини у лікарській формі у відсотках:

$$\Delta_{As}\% = \frac{B_H - B_L}{2} \times 0,32 \quad [12].$$

У зв'язку з тим, що монографію на лікарську форму міноксиділу не включено до ДФУ, згідно із статтею Британської Фармакопеї «Minoxidil Scalp Application», відхилення вмісту діючої речовини від заявленої кількості у лосьйоні складає 95,0–110,0% [1]. Отже, максимально припустима невизначеність аналізу ($\Delta_{As}\%$) становить 2,40%.

За результатами розраховували метрологічні характеристики: середнє значення \bar{X} , відносне стандартне відхилення (RSD), відносний довірчий інтервал окремого (Δ_x) і середнього значення (Δ_x) (табл. 2).

Таблиця 2

Визначення збіжності результатів кількісного визначення міноксиділу у лікарській формі

Лікарська форма	\bar{X}	S	RSD, %	Δ_x	$\Delta_{As}\%$
«Minox 2» лосьйон міноксиділу 2% 50 мл	1,96	0,0109	0,557	2,03	2,40

Запропонована методика є точною на рівні збіжності, оскільки однієї довірчий інтервал Δ_x не перевищував максимально допустиму невизначеність аналізу ($\Delta_{As}\%$).

Список літератури

- Effect of minoxidil on proliferation and apoptosis in dermal papilla cells of human hair follicle / Han J. H., Kwon O. S., Chung J. H. [et al.] // J. Dermatol. Sci. – 2004. – Vol. 34 (2). – P. 91–98.
- British Pharmacopeia. – London: Her Majesty's Stationery Office, 2009.
- United States Pharmacopeia 26. – USP Convention Inc. – Rockville, 2007.
- Patterson S.C. Development and validation of a procedure for the determination of minoxidil in hair-regrowth formulations using two variants of capillary zone electrophoresis. / Patterson S. C., Ramstad T., Mills K. A. // Il Farmaco. – 2005. – Vol. 60 (6–7). – P. 547–554.
- A method for the determination of minoxidil in hair-regrowth formulations by micellar electrokinetic capillary chromatography. / Gibson G., Ramstad T., Mills K. A., Dunn M. J. // Il Farmaco. – 2005. – Vol. 60 (10). – P. 847–853.
- Rapid determination of minoxidil in human plasma using ion-pair HPLC. / Zarghi A., Shafaati A., Foroutan S. M., Khoddam A. // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2004. – Vol. 36 (2). – P. 377–379.
- High-performance liquid chromatography-diode array and electrospray-mass spectrometry analysis of non-allowed sub-

Таблиця 3
Визначення правильності результатів кількісного визначення міноксиділу у лікарській формі

Лікарська форма	Взято, мг/100 мл	Добавка, мг/100 мл	Z'	$\bar{Z} \pm \Delta_Z$	$ \bar{Z} - 100 $
«Minox 2» лосьйон міноксиділу 2% 50 мл	0,640	0,100	99,67	99,78 $\pm 0,419$	0,220
	0,640	0,200	99,70		
	0,640	0,300	99,97		

Примітка: * – середнє для трьох визначень.

Правильність. Для встановлення правильності методики використано метод добавок, у ході якого до трьох рівних проб лікарської форми додавали різні кількості стандартного розчину міноксиділу та тричі аналізували.

Згідно з ДФУ, результати визначень є правильними, якщо вони не обтяжені значущою систематичною похибкою, тобто справжнє значення величини, що визначається, потрапляє у встановлений довірчий інтервал. Отже, запропонована методика є правильною, оскільки, як видно з таблиці 3, відхилення \bar{Z} від 100% не перевищує свій довірчий інтервал.

Для перевірки робастності методики кількісного визначення вивчали стабільність розчинів у часі. Випробовуваний розчин і розчин порівняння є стійкими протягом щонайменше 30 хв.

Висновки

Розроблено нову чутливу, економічну та експресну спектрофотометричну методику кількісного визначення міноксиділу в лікарській формі для зовнішнього застосування за власним поглинанням. Проведено валідацію запропонованої методики і доведено її відповідність вимогам ДФУ за основними валідаційними характеристиками: лінійністю, збіжністю, правильністю та робастністю.

- stances in cosmetic products for preventing hair loss and other hormone-dependent skin diseases. / De Orsi D., Pellegrini M., Pichini S. [et al.] // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2004. – Vol. 48 (3). – P. 641–648.
- Fast determination of minoxidil by photometric flow titration. / de Sousa R.A., Semaan F.S., Baio J.A.F., Cavalheiro E.T.G. // Eclética Química. – 2005. – Vol. 30 (3). – P. 79–84.
- Determination of minoxidil by bleaching the permanganate carrier solution in a flow-based spectrophotometric system. / de Sousa R.A., Semaan F.S., Cervini S., Cavalheiro E.T.G. // Analytical Letters. – 2011. – Vol. 44 (1–3). – P. 349–359.
- Булатов М.И. Практическое руководство по фотометрическим методам анализу / Булатов М.И., Калинин И.П. – Л.: Химия, 1986. – 432 с.
- Державна Фармакопея України. – 1-е вид. – Харків: PIPEG, 2001. – С. 58–68.
- Державна Фармакопея України. – 1-е вид. – Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – Доповнення 2. – 2008. – С. 85–101.
- Analytical method validation and instrument performance verification / [ed. by Chung Chow Chan et al.]. – John Wiley & Sons, Inc. – 2004. – P. 11–51.

Відомості про авторів:

Монайкіна Ю.В., к. фарм. н., асистент каф. аналітичної хімії ЗДМУ.
Васюк С.О., д. фарм. н., професор, зав. каф. аналітичної хімії ЗДМУ.
Гладишев В.В., д. фарм. н., професор, зав. каф. технології ліків ЗДМУ.

Надійшла в редакцію 22.04.2013 р.