

УДК 615.356:543.421./424

С.В. ГАРНА, К.І. ПРОСКУРИНА, В.А. ГЕОРГІЯНЦІ

Національний фармацевтичний університет

ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ НІКОТИНАМІДУ МЕТОДОМ СПЕКТРОФОТОМЕТРІЇ У СКЛАДІ КОМПЛЕКСНОГО ФІТОПРЕПАРАТУ

Вперше проведено валідацію методики кількісного визначення нікотинаміду методом спектрофотометрії у комплексному фітопрепараті. Валідацію здійснено відповідно до вимог Державної фармакопеї України. Результати дослідження свідчать, що методика може бути коректно відтворена та придатна для подальшого використання при контролі якості даного препарату.

Ключові слова: нікотинамід; комплексний фітопрепарат; валідація; кількісний аналіз; спектрофотометрія

ВСТУП

Актуальним завданням фармацевтичної науки сьогодні є пошук, створення та стандартизація нових лікарських засобів. Особливу увагу при цьому приділяють розробці та стандартизації складних комбінованих фітохімічних лікарських засобів, адже досвід фітотерапії доводить, що лікувальна взаємодія лікарських рослин у таких препаратах виявляється у взаємному потенціюванні відомих видів дій біологічно активних речовин рослин [8]. Звичайно, при цьому виникають складнощі з аналізом окремих інгредієнтів внаслідок взаємного впливу на результати аналізу великої кількості біологічно активних речовин. Тому велике значення для методик аналізу має пробопідготовка, що дозволяє нівелювати вплив окремих інгредієнтів.

Для дослідження нами було обрано комбінований фітопрепарат «Седавіт, розчин», розроблений нами раніше, який містить збалансований якісний і кількісний склад інгредієнтів. Біологічно активні речовини препарату виявляють комплексний вплив на організм, що виражається у седативній, анксиолітичній дії та посиленні здатності переносити максимальні фізичні навантаження [4, 5].

Складовою частиною цього препарату є нікотинамід. Метою даної роботи була валідація методики кількісного визначення нікотинаміду у складі препарату «Седавіт, розчин» відповідно до вимог Державної фармакопеї України (ДФУ) [1, 2, 3].

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

При проведенні досліджень було використано субстанцію робочого стандартного зразку нікотинаміду виробництва фірми «China Jiangsu Medicines & Health Products Import & Export (Group) Corporation» (серія № 2074021) та препарат «Седавіт, розчин», який має наступний склад: комплексний екстракт лікарських рослин – 94 мл, піридоксину гідрохлориду – 0,06 г, нікотинаміду – 0,3 г, сорбіту – 10 г.

Для проведення досліджень використовували наступне аналітичне обладнання: ваги AB 204 S/A METTLER TOLEDO, спектрофотометр «SPECORD 200», мірний посуд класу А, який відповідає ДСТУ 29228-91 [6]. Визначення проводили за методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ-області та у видимій області (2.2.25) [1]. Статистичну обробку експериментальних даних проводили відповідно до статті ДФУ «Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту» [2].

Методика кількісного визначення нікотинаміду: 5,00 мл препарату поміщають у центрифужну пробірку, додають воду, розчин свинцю ацетату, перемішують і центрифугують при 5000 об/хв протягом 5 хв. Центрифугат зливають у мірну колбу місткістю 50,00 мл. До осаду у центрифужній пробірці додають воду, перемішують і центрифугують при 5000 об/хв протягом 5 хв. Центрифугат зливають у ту ж мірну колбу, додають розчин натрію сульфату, доводять об'єм розчину водою до мітки і перемішують. Через 20 хв розчин фільтрують через паперовий фільтр, відкидаючи перші 10 мл фільтрату (розчин А).

**КРИТЕРІЇ ПРИЙНЯТНОСТІ
МЕТРОЛОГІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК
МЕТОДИКИ**

Критерії прийнятності метрологічних характеристик	Величини критичних значень, %
Допуски за ДФУ	±10
Максимально допустима повна невизначеність методики – $max\Delta_{As}$	3,2
Максимальна систематична похибка – $max\delta$	1,02
Критичне значення залишкового стандартного відхилення – RSD_a	1,81
Індекс кореляції – R_c	0,9924
Критичне практично незначуще значення вільного члена – a	5,12

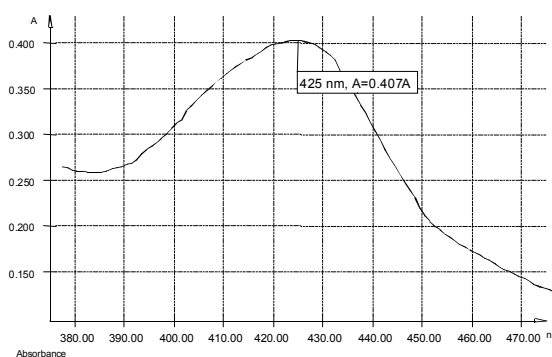


Рис. 1. Спектр поглинання нікотинамід у водному розчині.

У конічну колбу поміщають 1,00 мл розчину А, додають розчин натрію фосфату двозаміщеного, розчин роданобромідний і нагрівають при температурі від 75 до 80°C на водяній бані. Розчин охолоджують до кімнатної температури, додають розчин кислоти сульфанилової 1%, кількісно переносять у іншу мірну колбу місткістю 25,00 мл за допомогою води, доводять об'єм розчину водою до мітки і перемішують.

Паралельно вимірюють оптичну густину отриманого розчину на спектрофотометрі при довжині хвилі 425 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи у якості розчину порівняння воду.

Паралельно вимірюють оптичну густину розчину, що містить 1,00 мл розчину робочого стандартного зразка (РСЗ) нікотинамід, виготовленого аналогічно випробуваному розчину.

Вміст нікотинамід (X_i) у 1,00 мл препарату, у грамах, обчислюють за формулою (1):

$$X_i = \frac{D \times m_0 \times 0,05}{D_0}, \quad (1)$$

де: D – оптична густина випробуваного розчину;
 D_0 – оптична густина розчину РСЗ нікотинамід;

m_0 – маса наважки РСЗ нікотинамід (г).

Допустимі норми вмісту нікотинамід становлять 0,0027 – 0,0033 г у 1,00 мл препарату.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для уникнення впливу фенольних сполук, що містяться у розчині, їх попередньо осаджували за допомогою солей плюмбуму. Для підвищення специфічності використовували здатність похідних піридину утворювати в реакції з роданобромідним реактивом похідне глутаконового альдегіду, що при взаємодії з кислотою сульфаниловою приводить до забарвлених основ Шифа.

При проведенні кількісного визначення нікотинамід методом спектрофотометрії було обрано діапазон застосування методики від 80,00 до 120,00% від номінального вмісту нікотинамід у 1,00 мл препарату (0,003 г) за вимогами ДФУ [1] (допуски вмісту становлять (± 10%).

Для оцінки метрологічних характеристик досліджуваної методики були попередньо розраховані критерії прийнятності, наведені у табл. 1.

Критерії прийнятності метрологічних характеристик розраховували згідно з вимогами ДФУ [3].

На початку експерименту провели дослідження спектра поглинання нікотинамід у водному розчині. (рис. 1). Отримані дані свідчать, що спектр поглинання нікотинамід у водному розчині має наявний максимум при довжині хвилі 425 нм.

Відповідно до вимог ДФУ для методик кількісного визначення необхідно визначати такі валідаційні характеристики: правильність, збіжність, лінійність, відтворюваність, робастність [1, 3].

Проведено вивчення залежності оптичної густини від часу на протязі обраного інтервалу: через 15, 30, 45 та 60 хв. [7]. Для отриманих величин оптичної густини розраховували середнє відносне стандартне відхилення (RSD_t) та відносний довірчий інтервал (Δt), який не повинен перевищувати значення максимальної систематичної похибки. Виходячи з отриманих даних (табл. 2) випробовуванні розчини характеризуються стабільністю.

Для вивчення впливу рН середовища штучно створювали коливання рН ±10% [7]. В експерименті виявили, що вплив коливань не вносить змін до величин оптичної густини та не перевищує максимальну невизначеність методики (табл. 2).

Дослідження лінійності аналітичної методики проводили на всьому діапазоні застосування методики на п'яти модельних розчинах з кон-

центрацією нікотинаміду 80,00, 90,00, 100,00, 110,00, 120,00% від номінального вмісту [7]. Одержані результати для методики визначення розчину наведено у табл. 2. Побудову калібрувального графіка (рис. 2.) проводили у нормалізованих координатах [7]. Одержані результати свідчать, що у нашому випадку виконуються вимоги щодо параметрів лінійної залежності, тобто лінійність методик підтверджується на всьому діапазоні концентрацій (80,00–120,00%).

Правильність та збіжність методики вивчали за результатами аналізу тих самих модельних розчинів. Результати вивчення правильності та збіжності відповідають вимогам ДФУ (табл. 2) [1 – 3].

Таблиця 2

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ
МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО
ВИЗНАЧЕННЯ НІКОТИНАМІДУ
МЕТОДОМ СПЕКТРОФОТОМЕТРІЇ**

Валідаційні характеристики	Отримані та критичні значення (допуск ± 10 %), %		
	лаб. № 1	лаб. № 2	
Стабільність у часі $\Delta_t \leq \max \delta, \%$	0,63 ≤ 1,02	0,31 ≤ 1,02	
Стабільність до змін $\Delta_{PH} \leq \max \delta, \%$	0,38 ≤ 1,02	0,53 ≤ 1,02	
Збіжність $\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As}, \%$	1,97 ≤ 3,20	1,75 ≤ 3,20	
Правильність $\delta \leq \max \delta, \%$	0,54 ≤ 1,02	0,37 ≤ 1,02	
Лінійність	$R_{\text{resid}} \leq \text{RSD}_{0,2} \%$	0,95 ≤ 1,81	1,39 ≤ 1,81
	$a \leq \max a, \%$	0,65 ≤ 5,12	0,89 ≤ 5,12
	$r \geq R_c$	0,9975 ≥ 0,9924	0,9989 ≥ 0,9924
Відтворюваність, $\Delta_{\text{intra}} \leq \max \Delta_{As}, \%$	1,02 ≤ 3,20		

Відтворюваність оцінювали шляхом проведення міжлабораторних досліджень. Отримані результати відносного довірчого інтервалу середнього значення Δ_{intra} підтвердили коректність методики при її відтворенні в умовах різних лабораторій (табл. 2).

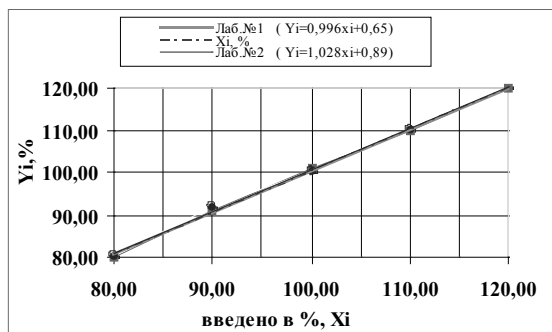


Рис. 2. Графік залежності оптичної густини від концентрації нікотинаміду в нормалізованих координатах.

Результати дослідження валідаційних характеристик даної методики дозволяють рекомендувати її для проведення кількісного визначення нікотинаміду у препараті «Седавіт, розчин».

ВИСНОВКИ

1. Проведено процедуру валідації методики кількісного визначення нікотинаміду методом спектрофотометрії у комплексному фітопрепараті за валідаційними характеристиками: робастність, лінійність, правильність, збіжність, відтворюваність відповідно до вимог ДФУ. Отримані метрологічні характеристики методики не перевищують критерії прийнятності відповідно до вимог ДФУ.

2. За отриманими даними досліджувана методика може бути використана при кількісному визначенні нікотинаміду у препараті «Седавіт, розчин».

**ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ
ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ**

1. Гарна С.В. Обґрунтування складу лікарського засобу седативної дії / [С.В. Гарна, А.І. Русинів, В.А. Георгіянц, Н.Ф. Маслова та ін.] // Актуальні питання фармац. і мед. науки і практики. – 2010. – Вип. 23, № 2. – С. 13-16.
2. Гризодуб А.И. Стандартизованная процедура валідації методик кількісного аналізу лікарських засобів методом стандарта / [А.И. Гризодуб, Д.А. Леонтьев, Н.В. Денисенко, Ю.В. Подпружников] // Фармаком. – 2004. – № 3. – С. 3-17.
3. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х. : РІРЕГ, 2001. – 556 с.
4. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид., доп. 1. – Х. : РІРЕГ, 2004. – 520 с.
5. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид., доп. 2. – Х. : РІРЕГ, 2008. – 608 с.
6. Мачерет Є.Л. Седавіт – новий оригінальний заспокійливий засіб / Є.Л. Мачерет, Г.М. Чуприна // Новини медицини і фармації. – № 11 (139). – 2003. – С. 9.
7. Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Ч. 2. Пипетки градуированные без установленного времени ожидания: ГОСТ 29228-91. – М. : Изд-во стандартов, 1992. – 9 с.
8. Bisset E.G. Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals / E.G. Bisset. – Stuttgart : Medpharm Scientific Publishers, 2004. – 556 p.

УДК 615.356:543.421./424

С.В. Гарная, К.И. Проскурина, В.А. Георгиянц

**ВАЛИДАЦІЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИКОТИНАМИДА
МЕТОДОМ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ В СОСТАВЕ КОМПЛЕКСНОГО ФИТОПРЕПАРАТА**

Впервые проведено валидацию методики количественного определения никотинамида методом спектрофотометрии в комплексном фитопрепарате. Валидация была проведена согласно требованиям Государственной фармакопеи Украины. Результаты исследования свидетельствуют, что методика может быть корректно воспроизведена и пригодна для дальнейшего использования при контроле качества данного препарата.

Ключевые слова: никотинамид; комплексный фитопрепарат; валидация; количественный анализ; спектрофотометрия

UDC 615.356:543.421./424

S.V. Garna, K.I. Proskurina, V.A. Georgiyants

**VALIDATION OF TECHNIQUE OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF NICOTINAMIDE
IN COMPLEX HERBAL REMEDY BY THE METHOD OF SPECTROPHOTOMETRY**

Validation of the technique of quantitative determination of the nicotinamide in complex herbal remedy was carried out by the method of spectrophotometry for the first time. Validation according to the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine was carried out. Results give foundation that the technique can be correctly reproduced and can be appropriate for further using by the qualitative control of this complex herbal remedy.

Key words: nicotinamide; complex herbal remedy; validation, quantitative determination; spectrophotometry

Адреса для листування:
61022, м. Харків, пл. Повстання, 17.
Тел. (057) 731-92-76
E-mail: garnaya57@mail.ru.

Надійшла до редакції:
09.12.2011