



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

Застосування УФ-спектрофотометрії для розробки та валідації методики кількісного визначення вінпоцетину в субстанції

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова:

спектрофотометрія, вінпоцетин, кількісне визначення.

Ключевые слова:

спектрофотометрия, винпоцетин, количественное определение.

Key words:

spectrophotometry,

vinpocetine, quantitative determination.

Запропоновано нову спектрофотометричну методику кількісного визначення вінпоцетину в субстанції. Методика базується на вимірюванні абсорбції розчинного препарату у 0,05 М розчині хлористоводневої кислоти при 272 нм. Лінійна залежність спостерігається в межах концентрації вінпоцетину 1,92–3,20 мг/100 мл, коефіцієнт кореляції становить 0,9999. За такими валідаційними характеристиками, як лінійність, діапазон застосування, точність, правильність і робастність методика відповідає вимогам ДФУ.

Предложена новая спектрофотометрическая методика количественного определения винпоцетина в субстанции. Методика основана на измерении абсорбции раствора препарата в 0,05 М растворе хлористоводородной кислоты при 272 нм. Линейная зависимость наблюдается в границах концентраций винпоцетина 1,92–3,20 мг/100 мл, коэффициент корреляции составляет 0,9999. Методика соответствует требованиям ГФУ по таким валідаційним характеристикам, как линейность, диапазон применения, точность, правильность и робастность.

A new spectrophotometric method for the quantitative determination of vinpocetine in bulk is proposed. This method is based on absorption measurement of vinpocetine solutions in 0.05 M hydrochloric acid at 272 nm. The linearity range was found to be 1,92–3,20 mg/100ml with correlation coefficient 0,9999. The proposed method is valid according to the validation requirements of The Ukrainian Pharmacopeia.

Вінпоцетин, (3 α ,16 α)-ебурнаменін-14-карбоксілової кислоти етиловий ефір, є похідним вінкаміну і широко використовується в медичній практиці при цереброваскулярних і когнітивних розладах [1]. Найбільш розповсюдженим методом кількісного визначення вінпоцетину в субстанції та лікарських препаратах є високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) [2–6]. Застосування ВЕРХ дозволяє проводити аналіз без попереднього розділення компонентів суміші, одночасно визначати близькі за структурою речовини, а також проводити аналіз у біологічних рідинах. На жаль, цей метод потребує обладнання високої вартості, що найчастіше відсутнє у звичайних лабораторіях. Спектрофотометрія в УФ області спектра, хоча дещо поступається ВЕРХ у специфічності, але є на сьогодні одним із найдешевших, експресних та економічних методів аналізу, що дозволяє проводити контроль якості субстанцій і фармацевтичних препаратів за показником «кількісний вміст». Для вінпоцетину в літературі описані методики кількісного визначення із застосуванням похідних УФ-спектрів: спектрофотометрія першої та другої похідної, а також першої похідної співвідношення [6]. Дані щодо існування валідної спектрофотометричної методики кількісного визначення вінпоцетину в субстанції за власним поглинанням відсутні.

Мета роботи

Розробка методики кількісного визначення вінпоцетину в субстанції із застосуванням прямої УФ-спектрофотометрії та проведення її валідації згідно ДФУ [7,8].

Матеріали і методи дослідження

Об'єкти дослідження, розчинники та обладнання

Об'єктом дослідження була субстанція вінпоцетину.

В якості розчинників використовували 0,05 М розчин хлористоводневої кислоти та воду дистильовану. В якості стандарту використовували РСЗ німодипіну.

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

Методика кількісного визначення вінпоцетину в субстанції

Точну наважку вінпоцетину (0,0120–0,0200) вміщували в мірну колбу ємністю 25 мл, розчиняли в 0,05 М розчині хлористоводневої кислоти та доводили тим же розчинником до позначки, перемішували. 1 мл отриманого розчину переносили в мірну колбу ємністю 25 мл та доводили водою дистильованою до позначки. Оптичну густину вимірювали на фоні води дистильованої за довжини хвилі 272 нм. Паралельно проводили визначення з 1 мл 0,064% розчину порівняння вінпоцетину, що готували шляхом розчинення точної наважки в 0,05 М розчині хлористоводневої кислоти. Розрахунок вмісту діючої речовини у відсотках проводили за формулою:

$$C_{\%} = \frac{A \cdot C_0 \cdot 25,00 \cdot 25,00}{A_0 \cdot p \cdot 1,00 \cdot l},$$

де A – оптична густина досліджуваного розчину;

A_0 – оптична густина розчину порівняння;

C_0 – концентрація спектрофотометрованого розчину порівняння вінпоцетину (0,00256 г у 100 мл);

p – наважка субстанції, г;

l – товщина шару, см.

Результати та їх обговорення

При виборі розчинника для розробки методики кількісного визначення вінпоцетину за власним поглинанням враховували розчинність субстанції та стійкість отриманих розчинів, а також доступність і нетоксичність розчинника. Виходячи з даних спеціальної літератури, вінпоцетин є нерозчинним у воді, але розчиняється в метанолі, етанолі, *n*-пропанолі, а також у розчинах кислот. Використання метанолу в якості розчинника є недоцільним, оскільки останній може викликати рандомізацію вінпоцетину [10]. Натомість застосування етанолу, *n*-пропанолу в якості розчинників цілком можливе. Використання кислот для розчинення вінпоцетину може спричинити гідроліз останнього. Але в роботі [6] доведено, що використання хлористоводневої кислоти у концентрації 0,1 М для приготування розчинів вінпоцетину є цілком безпечним і не викликає побічних реакцій. Отже, для подальшої роботи в якості розчинника обрано 0,05 М розчин хлористоводневої кислоти, як найдешевший і нетоксичний розчинник.

УФ-спектр вінпоцетину в 0,05 М розчині хлористоводневої кислоти характеризується 4 смугами поглинання (200–212 нм, 215–240 нм, 240–290 нм і 295–340 нм) (рис. 1). Найбільш придатними для кількісного визначення вінпоцетину є третя та четверта смуги поглинання, оскільки знаходяться у порівняно селективній області спектра і є характеристичними. Однак, використання третьої смуги для аналізу зменшить похибку визначення, завдяки більш пологому максимуму [10]. Крім того, молярний коефіцієнт поглинання вінпоцетину, що характеризує чутливість визначення, при 272 нм ($\epsilon=11471$) у 1,5 рази перевищує зазначений коефіцієнт при 315 нм ($\epsilon=7281$).

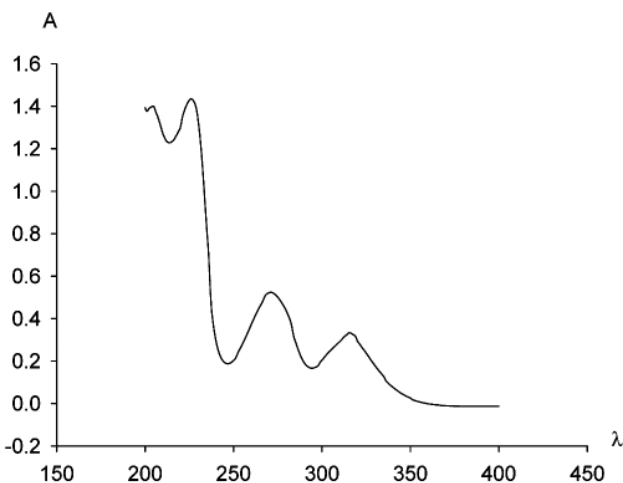


Рис. 1. Спектр поглинання 0,0016% розчину вінпоцетину.

Валідація методики

Розроблена методика кількісного визначення вінпоцетину валідована відповідно до вимог ДФУ, згідно стандартизованої процедури валідації методик кількісного аналізу лікарських засобів методом стандар-

ту [7,8]. Визначено такі основні валідаційні характеристики, як лінійність, діапазон застосування методики, збіжність, правильність і робастність.

Лінійність і діапазон застосування методики

Лінійність визначали у межах концентрацій, в яких спостерігається підпорядкування закону Бера, а саме 1,92–3,20 мг/100 мл. Розчини з відомою концентрацією отримували шляхом розведення стандартного 0,064% розчину вінпоцетину і вимірювали оптичну густину при 272 нм. Виходячи з отриманих даних, будували графік залежності абсорбції від концентрації досліджуваної речовини (рис. 2).

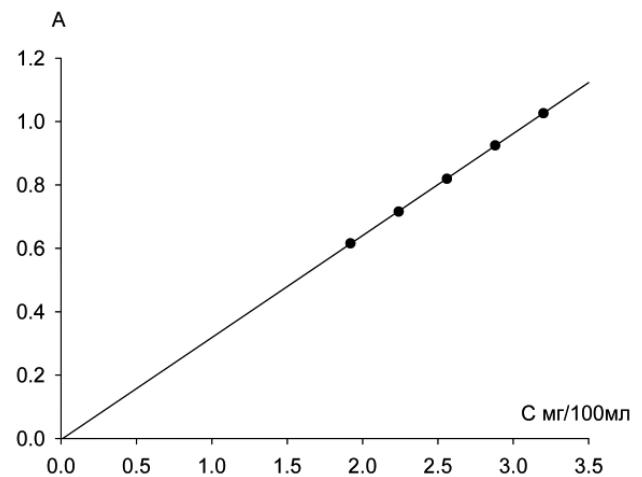


Рис. 2. Графік залежності оптичної густини від концентрації вінпоцетину.

Параметри лінійної залежності розраховували за допомогою регресійного аналізу методом найменших квадратів. Знайдено: $y_i = 0,3219 x_i - 0,0037$. Отримані величини: коефіцієнти b , a , стандартні відхилення для b і a – s_b , s_a , відносне залишкове стандартне відхилення по осі абсцис $s_{x,0}(\%)$ і коефіцієнт кореляції r наведено в табл. 1.

Таблиця 1

Параметри лінійної залежності

| Параметри | Значення |
|------------------------------------|-----------------|
| Рівняння регресії | $A=b \cdot C+a$ |
| Кутовий коефіцієнт b | 0,3219 |
| Вільний член a | -0,0037 |
| s_b | 0,0014 |
| s_a | 0,0038 |
| Коефіцієнт кореляції r ($n=5$) | 0,9999 |
| $s_{x,0}(\%)$ | 0,1820 |

Статистичну якість отриманої моделі характеризують залишковим стандартним відхиленням за всією абсцис $s_{x,0}$, що має таку ж саму розмірність, що і вміст речовини. Згідно ДФУ, відносне залишкове стандартне відхилення за всією абсцис $s_{x,0}(\%)$ не має перевищувати $\Delta_{As}(\%)/t(95;n-2)$ [8]. Максимально припустима невизначеність (Δ_{As}) дорівнює відносному допуску вмісту ($B\%$) аналізованої субстанції. Оскільки

Визначення правильності та точності результатів кількісного визначення вінпоцетину

| Лікарська речовина | X | 100 - X | RSD, % | Δ_x | Δ_x | Δ_{As} |
|--------------------|-------|---------|--------|------------|------------|---------------|
| Вінпоцетин | 99,86 | 0,14 | 0,5134 | 0,9547 | 0,3946 | 1,00 |

монографію на вінпоцетин не включено в ДФУ, згідно загальної статті ДФУ «Субстанції» відносний допуск вмісту складає 1% [7,8]. Отримане значення відносного залишкового стандартного відхилення за віссю абсцис $s_{x,0}(\%)$ 0,1820 не перевищує $\Delta_{As}(\%)/(95;n-2)$, що дорівнює 0,4249.

Виконання нерівності $a \leq \Delta a$ ($0,0037 < 0,008943$) доводить відсутність систематичної похибки методу.

Отже, виходячи з отриманих даних, лінійність методики підтверджується у всьому зазначеному інтервалі концентрацій, а діапазон застосування методики складає 75–125% від номінальної концентрації вінпоцетину.

Збіжність і правильність

З трьох наважок досліджуваної речовини готували 3 розчини, з кожним з яких проводили по 3 паралельні виміри за аналітичної довжини хвилі (всього 9). Абсорбцію розчину порівнювали вимірювали паралельно. Вміст вінпоцетину у відсотках розраховували за формулою (1).

На основі отриманих результатів розраховували середнє значення \bar{X} , відносне стандартне відхилення (RSD), відносний довірчий інтервал окремого (Δ_x) і середнього значення ($\Delta_{\bar{x}}$) (табл. 2).

Згідно ДФУ, якщо 95% довірчий інтервал \bar{X} включає

теоретичне значення 100%, різниця $|\bar{X}-100|$ є статистично незначущою та виключає наявність систематичної похибки. Запропонована методика є правильною, оскільки виконується нерівність $|\bar{X}-100| \leq \Delta_{\bar{x}}$.

Згідно ДФУ, методика є точною на рівні збіжності, якщо однобічний інтервал окремого значення (Δ_x) не перевищує максимально припустиму невизначеність (Δ_{As}) – 1%. Виходячи з наведених у табл. 2 даних, запропонована методика є точною.

Робасність

Оцінку робасності проводили на стадії розробки методики, тобто встановлювали стабільність розчинів у часі. Виявлено, що оптична густина забарвлених розчинів залишається стабільною протягом години.

Висновки

Розроблено селективну, чутливу, економічну й експресну спектрофотометричну методику кількісного визначення вінпоцетину в субстанції за власним поглинанням, валідовану згідно стандартизованої процедури валідації методом стандарту. Доведено, що опрацьована методика відповідає вимогам ДФУ за основними валідаційними характеристиками, а саме лінійністю, збіжністю, правильністю і робасністю.

Література

1. Машковський М.Д. Лекарственные средства: В 2 ч. / М.Д. Машковський. – М.: Медицина, 1998. – Ч. 1. – С. 433–434.
2. Gazdag M. High-performance liquid chromatography of eburnane alkaloids. III. Application of different phase systems / Gazdag M. Szepesi G., Csomor K. // J. Chromatogr. – 1981. – Vol. 243. – P. 315–322.
3. Wang X. Determination of vinpocetine and related substances in pharmaceutical tablets by HPLC / Wang X. // Yaowu Fenxi Zazhi. – 1995. – Vol. 15. – P. 23–26.
4. Elbary A. Abd. Reversed-phase liquid chromatographic determination of vinpocetine in human plasma and its pharmacokinetic applications / Elbary A. Abd., Foda N., El-Gazayerly O., El Khatib M. // Anal. Lett. – 2002. – Vol. 35. – P. 1041–1054.
5. Herenyi B. Chiral high-performance liquid chromatographic separations on an l-acid glycoprotein column. II. Separation of the diastereomeric and enantiomeric analogues of vinpocetine (Cavinton) / Herenyi B., Goeroeg S. // J. Chromatogr. – 1992. – Vol. 592. – P. 297–299.
6. Alaa El-Gindy. Spectrophotometric and liquid chromatographic determination of fenofibrate and vinpocetine and their hydrolysis products / Alaa El-Gindy, Samy Emara, Mostafa K. Mesbah, Ghada M. Hadad // Il Farmaco. – 2005. – Vol. 60, № 5. – P. 425–438.
7. Державна Фармакопея України. – 1-е вид. – Харків: PIPEГ, 2001. – С. 58–68.
8. Державна Фармакопея України. – 1-е вид. – Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – Доповнення 2. – 2008. – С. 85–101.
9. Lohmann A. New assay method for the determination of vinpocetine in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry without transesterification caused by solvents / Lohmann A., Dingler E. // J. Chromatogr. Biomed. App. – 1991. – Vol. 567, №2. – P. 506–507.
10. Булатов М.И. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа – 5-е изд. / Булатов М.И., Калинин И.П. – Л.: Химия, 1986. – 432 с.

Відомості про авторів:

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

Адреса для листування:

Монайкіна Юлія Віталіївна. 69035, м. Запоріжжя, пр-т Маяковського, 26, каф. аналітичної хімії ЗДМУ.
Тел.: (0612) 34 21 81.