

Ю.В. Бурлака, О.О. Тарханова, С.О. Васюк, В.В. Гладисhev

РОЗРОБКА І ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ НІМОДИПІНУ В СУБСТАНЦІЇ

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: спектрофотометрія, німодипін, субстанція, кількісне визначення.

Ключевые слова: спектрофотометрия, нимодипин, субстанция, количественное определение.

Key words: spectrophotometry, nimodipine, substance, quantitative determination.

Розроблено нову спектрофотометричну методику кількісного визначення німодипіну в субстанції, що базується на вимірюванні абсорбції розчину препарату в етанолі при 359 нм. Лінійна залежність спостерігається в межах 2,4–4,8 мг/100 мл, коефіцієнт кореляції становить 0,9999. Методика характеризується високою чутливістю, простотою виконання й відповідає вимогам ДФУ за валідаційними характеристиками.

Разработана новая спектрофотометрическая методика количественного определения нимодипина в субстанции, основанная на измерении абсорбции раствора препарата в этаноле при 359 нм. Линейная зависимость наблюдается в пределах 2,4–4,8 мг/100 мл, коэффициент корреляции составляет 0,9999. Методика характеризуется высокой чувствительностью, простотой исполнения и соответствует требованиям ГФУ по валидационным характеристикам.

A new spectrophotometric method for the quantitative determination of nimodipine in pharmaceutical substances is developed. This method is based on measurement of ethanolic nimodipine solutions absorption at 359 nm. The linearity ranges were found to be 2,4–4,8 mg/100 ml with correlation coefficient 0,9999. The proposed method is highly sensitive, simple for routine quality control and valid according to the requirements of Ukrainian Pharmacopoeia.

Німодипін є селективним блокатором кальцієвих каналів II класу. В медичній практиці його застосовують для профілактики і лікування ішемічних неврологічних розладів, спричинених спазмом судів головного мозку на фоні субарахноїдального крововиливу внаслідок розриву аневризми [1].

Згідно Британської Фармакопеї, субстанцію німодипіну кількісно визначають цериметричним титруванням у середовищі суміші 2-метил-2-пропанолу й хлорної кислоти з індикаторним (розчин фероїну) фіксуванням точки кінця титрування [2]. Але слід враховувати, що точність титриметричних методів значною мірою залежить від умов проведення аналізу, правильного вибору індикатора, кваліфікації аналітика. Також важливо, що більшість розходжень при оцінці титриметричних методів пов'язана з суб'єктивним визначенням точки кінця титрування.

Сучасний фармацевтичний аналіз характеризується широким застосуванням фізико-хімічних (головним чином, хроматографічних і спектрофотометричних) методів для оцінки якості лікарських засобів. Серед них пряма спектрофотометрія в УФ області спектра залишається найпростішим, найбільш економічним і достатньо чутливим методом аналізу [3].

МЕТА РОБОТИ

Розробка методики кількісного визначення німодипіну в субстанції за власним поглинанням і проведення її валідації згідно ДФУ [4,5].

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єкти дослідження, розчинники та обладнання

Об'єктом дослідження була субстанція німодипіну. В якості розчинника застосовували етанол. Аналітичне обладнання: спектрофотометр Specord 200, ваги електронні АВТ-120-5DM, мірний посуд класу А.

Методика кількісного визначення німодипіну в субстанції

Точну наважку німодипіну (0,015–0,03) вміщували в мірну колбу ємністю 50 мл, розчиняли в етанолі й доводили етанолом до позначки, перемішували. 2 мл одержаного розчину переносили в мірну колбу ємністю 25 мл і доводили етанолом до позначки. Оптичну густину вимірювали на фоні етанолу при довжині хвилі 359 нм. Паралельно проводили визначення з 2 мл 0,045% розчину порівняння німодипіну, який готували шляхом розчинення в етанолі точної наважки субстанції німодипіну, що відповідає вимогам АНД. Розрахунок вмісту діючої речовини у відсотках проводили за формулою:

$$C_{z/1мл} = \frac{A \cdot C_0 \cdot 50,00 \cdot 25,00}{A_0 \cdot p \cdot 2,00 \cdot l}$$

де A – оптична густина досліджуваного розчину;

A_0 – оптична густина розчину порівняння;

C_0 – концентрація спектрофотометрованого розчину порівняння німодипіну (0,0036 г у 100 мл);

p – наважка субстанції, г;

l – товщина шару, см.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

УФ-спектр німодипіну в етанолі характеризується 4 смугами поглинання. Перша спостерігається при 190–215 нм (λ_{\max} = 203 нм, ϵ = 8920). Вона зумовлена $\pi \rightarrow \pi^*$ переходом бензольного кільця і $n \rightarrow \pi^*$ переходом карбонільних груп. Друга смуга – при 230–245 нм (λ_{\max} = 240 нм, ϵ = 25099) німодипіну викликається $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходом, що зумовлений об'єднанням карбонільної групи з кратним зв'язком. Третя смуга – при 260–290 нм (λ_{\max} = 268 нм, ϵ = 7075), зумовлена нітробензолом, частково перекривається короткохвильовою



смугою і має вигляд плеча. Четверта смуга – при 325–390 нм ($\lambda_{\max}=359$ нм, $\epsilon=6639$) викликається $n \rightarrow \pi$ переходом піридинового циклу в молекулі німодипіну [6] (рис. 1).

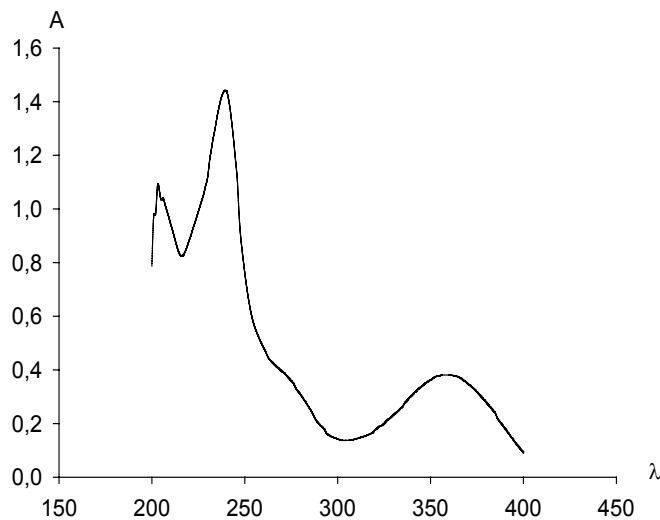


Рис. 1. УФ спектр поглинання німодипіну в етанолі.

Найбільш придатною для кількісного визначення німодипіну є четверта смуга поглинання, оскільки є специфічною і має пологий максимум, що зменшує похибку визначення [7].

Валідація аналітичної методики

Відповідно до вимог ДФУ [4,5], методики кількісного визначення, що включаються до аналітичної нормативної документації, мають бути валідовані. Проведено валідацію розробленої аналітичної методики «кількісне визначення» для субстанції німодипіну за основними валідаційними характеристиками (лінійністю, правильністю, точністю, робастністю), згідно стандартизованої процедури валідації методик кількісного аналізу лікарських засобів методом стандарту [4,5].

Згідно Британської Фармакопеї [2], до кількісного вмісту німодипіну в субстанції висуваються наступні вимоги: німодипіну повинно бути 98,5–101,5%. Виходячи з цього, можна визначити максимально припустиму невизначеність (Δ_{AS}), що дорівнює відносному допуску вмісту ($B\%$) аналізованої субстанції, тобто $\Delta_{AS}=B=1,5\%$ [5].

Лінійність визначали у межах 70–130% від номінальної концентрації німодипіну. Розчини з відомою концентрацією отримували шляхом розведення 0,04% розчину німодипіну (1,5; 1,8; 2,3; 2,5; 2,8; 3 мл) вміщували в колби ємністю 25 мл, доводили етанолом до позначки й вимірювали оптичну густину одержаних розчинів. На основі отриманих даних будували графік залежності оптичної густини від концентрації німодипіну (рис. 2).

Числові показники лінійної залежності розраховували за допомогою регресійного аналізу методом найменших квадратів. Знайдено: $y_i=0,1631 x_i+0,0024$. Одержані величини: коефіцієнти b , a , стандартні відхилення для b і a – s_b , s_a , залишкове стандартне відхилення $s_{x,0}$ (%) і коефіцієнт кореляції r наведено в табл. 1.

Коефіцієнт кореляції дозволяє судити про жорсткість лінійного зв'язку між величинами x та y : чим ближче

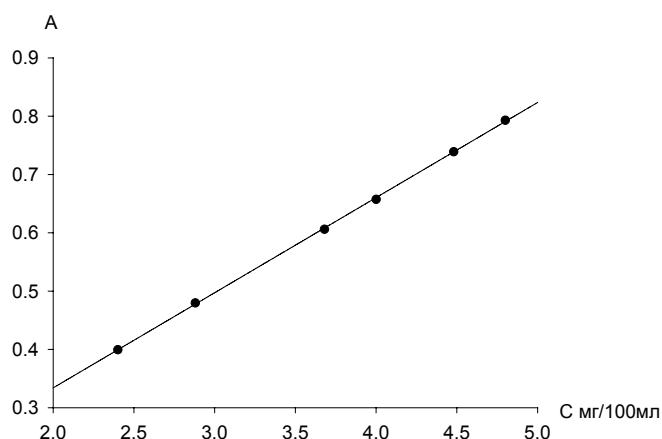


Рис. 2. Графік залежності оптичної густини від концентрації німодипіну.

абсолютна величина $|r|$ до одиниці, тим менш випадкова спостережувана лінійна залежність. Згідно даних спеціальної літератури, з аналітичною метою використовують лінійну залежність з коефіцієнтом кореляції $\geq 0,997$ [8].

Статистичну якість одержаної моделі характеризують залишковим стандартним відхиленням s_y , що має розмірність сигналу, або залишковим стандартним відхиленням по осі абсцис $s_{x,0}$, що має таку ж саму розмірність, що і вміст речовини. Згідно ДФУ, $s_{x,0}$ (%) не повинне перевищувати

$$\Delta_A \Delta_{AS} \Delta_{AS}(\%)/t(95;n-2) [5].$$

Відсутність систематичної похибки є обов'язковою умовою застосування методу стандарту (калібрування за однією точкою). У цьому випадку калібрувальна лінія має проходити через 0, а вільний член a має незначно відрізнятись від 0, тобто $a \leq \Delta a$. У випадку невиконання зазначеної нерівності ДФУ рекомендує перевіряти практичну незначущість одержаної систематичної похибки.

Кутовий коефіцієнт b характеризує собою коефіцієнт чутливості регресії ϵ (моль $^{-1}$ ·л·см $^{-1}$) та, відповідно, і метода, що валідується.

Одержані згідно ДФУ числові показники лінійної залежності свідчать про те, що виконуються усі вимоги щодо параметрів лінійної залежності, тобто лінійність методики підтверджується у обраних діапазонах концентрацій (табл. 1).

Таблиця 1

Числові показники лінійної залежності

Величина	Значення	Критерії	Висновок
$b \pm (s_b)$	0,1631±(0,0011)	–	–
$a \pm (s_a)$	0,0024±(0,0044)	$a \leq \Delta a = t(95\%;3) \cdot s_a = 0,0140$	відповідає
$s_{x,0}$ (%)	1,470	$\leq \Delta_{AS} = 1,500$	відповідає
r	0,9999	$\geq 0,997$	відповідає

Для оцінки збіжності та правильності з трьох наважок готували 3 розчини, з якими проводили по 3 паралельні виміри (всього 9). Вимірювали оптичну густину всіх 9 розчинів при аналітичній довжині хвилі. Паралельно вимірювали оптичну густину розчину порівняння. Роз-

раховували вміст у відсотках досліджуваної речовини за формулою (1). На основі одержаних результатів розраховували середнє значення \bar{X} , відносне стандартне відхилення (RSD), відносний довірчий інтервал окремого (Δ_x) і середнього значення ($\Delta_{\bar{x}}$) (табл. 2).

Таблиця 2

Визначення правильності й точності результатів кількісного визначення німодипіну

Лікарська речовина	\bar{X}	$ 100 - \bar{X} $	$RSD, \%$	Δ_x	$\Delta_{\bar{x}}$	Δ_s
Німодипін	99,99	0,01	0,7692	1,43	0,5912	1,5

Згідно ДФУ, якщо 95% довірчий інтервал $\bar{X}\bar{X}$ включає теоретичне значення 100%, різниця $|\bar{X} - 100|$ є статистично незначущою і виключає наявність систематичної похибки. Запропонована методика є правильною, оскільки виконується нерівність

$$|\bar{X} - 100| \leq \Delta_{\bar{x}} \leq \Delta_x$$

Згідно ДФУ, методика є точною на рівні збіжності, якщо одnobічний інтервал окремого значення (Δ_x) не перевищує максимально допустиму невизначеність (Δ_{AS}), що дорівнює відносному допуску вмісту ($B\%$) аналізованої субстанції: $\Delta_{AS} = B$. Виходячи з наведених у табл. 2 даних, запропонована методика є точною.

Для перевірки *робастності* методики кількісного визначення

вивчали стабільність розчинів у часі. Випробований розчин і розчин порівняння є стійкими протягом щонайменше 40 хв.

ВИСНОВКИ

Розроблено економічну, просту у виконанні, чутливу спектрофотометричну методику кількісного визначення німодипіну в субстанції. Визначено основні валідаційні характеристики (лінійність, діапазон застосування методики, точність, правильність і робастність). Доведено, що запропонована методика відповідає вимогам ДФУ за зазначеними показниками.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Машковський М.Д.* Лекарственные средства / *Машковський М.Д.* – М.: Новая волна, 2010. – С. 403–404.
2. British Pharmacopoeia. – Her Majesty's Stationery Office. – London, 2009.
3. *Kar A.* Pharmaceutical drug analysis / *Kar A.* – New Age International (P) Ltd., 2005. – P. 293–313.
4. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр» – 1-е вид. – Харків: ПІРЕГ, 2001. – С. 58–68.
5. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр» – 1-е вид. – Довоповнення 2. – Харків: ПІРЕГ, –2008. – С. 85–101.
6. *Казіцька Л.А.* Применение УФ-, ИК-, ЯМР- и масс-спектрокопии в органической химии / *Казіцька Л.А., Куплетская Н.Б.* – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1979. – 240 с.
7. *Булатов М.И.* Практическое руководство по фотометрическим методам анализа / *Булатов М.И., Калинин И.П.* – Л.: Химия, 1986. – 432 с.
8. 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:

Бурлака 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.
Гладишев В.В., д. фарм. н., професор, зав. каф. технології ліків ЗДМУ.

Адреса для листування:

Бурлака Юлія Віталіївна. 69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26, ЗДМУ.
Тел.: (0612) 224 69 23

Рецензент: проф. С.И. Коваленко
Поступила в редакцію 26.07.2010 г.