



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

Кількісне визначення ділтіазему в субстанції спектрофотометричним методом

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова:

спектрофотометрія, ділтіазем,
субстанція, кількісне визначення.

Ключевые слова:

спектрофотометрия, дилтиазем,
субстанция, количественное
определение.

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

Розроблено та валідовано нову спектрофотометричну методику встановлення кількісного вмісту ділтіазему в субстанції, заснована на вимірюванні абсорбції водного розчину препарату за довжини хвилі 237 нм. Запропонована методика відповідає вимогам ДФУ, що висуваються до аналітичних методик кількісного визначення лікарських речовин у субстанціях. Розрахована прогнозована повна невизначеність методики свідчить про її коректність і можливість відтворення в умовах інших лабораторій.

Разработана и валидирована новая спектрофотометрическая методика определения количественного содержания дилтиазема в субстанции, основанная на измерении абсорбции водного раствора препарата при длине волны 237 нм. Предложенная методика соответствует требованиям ГФУ, предъявляемым к методикам количественного анализа лекарственных веществ в субстанциях. Рассчитанная прогнозируемая полная неопределенность методики свидетельствует о ее корректности и возможности воспроизведения в условиях других лабораторий.

A new spectrophotometric method for the quantitative determination of diltiazem in pharmaceutical substances is developed and validated. The method is based on measurement of absorption of aqueous diltiazem solutions at 237 nm. The proposed method is valid according to the validation requirements of Ukrainian Pharmacopeia. The predicted total indeterminacy of the procedure confirms that the method is correct and could be used in quality control laboratories.

Захворювання серцево-судинної системи за поширеністю посідають одне з перших місць і потребують тривалої, а найчастіше навіть постійної підтримуючої терапії. Антагоністи кальцієвих каналів, представником яких є ділтіазем, завдяки антигіпертензивній та антиангінальній активності є препаратами вибору для лікування кардіологічних хвороб, особливо у випадках поєднання артеріальної гіпертензії з ішемічною хворобою серця. Безперечно, належна якість таких лікарських засобів є одним із найважливіших аспектів їх безпечного й ефективного застосування. Використання сучасних фізико-хімічних способів аналізу дозволяє забезпечити відповідний рівень контролю якості цих препаратів на всіх етапах виробництва – від субстанції до готового продукту. Тому для сучасного фармацевтичного аналізу актуальною є розробка високоточних, але при цьому валідних, доступних та експресних методик кількісного визначення.

Фармакопейні методики кількісного аналізу субстанції ділтіазему у Державній Фармакопеї України [1] та Британській Фармакопеї [2] представлені титруванням у неводному середовищі з потенціометричним фіксуванням точки кінця титрування, а також у Фармакопеї Сполучених Штатів [3] – методом рідинної хроматографії. Дані наукової літератури свідчать про використання для кількісного визначення ділтіазему вольтамперометричного способу аналізу [4], Раманівської спектроскопії у ближній ІЧ-області [5], спектрофотометрії у видимій ділянці спектра [6–8] та хроматографічних методів [9]. При детальному розгляді зазначених методик стає очевидним, що в більшості випадків їх недоліками

є тривалість процедури аналізу та пробопідготовки, значна вірогідність помилки в результаті застосування екстракції або висока вартість обладнання та його недоступність для лабораторій з контролю якості. Отже, нескладну та нетривалу у виконанні, високочутливу й валідну методику кількісного визначення ділтіазему за власним поглинанням в УФ області можна розглядати як розумну альтернативу існуючим методам.

Мета роботи

Розробка та валідація нової спектрофотометричної методики кількісного визначення ділтіазему в субстанції.

Матеріали і методи дослідження

Об'єкти дослідження, розчинники та обладнання

Об'єкт дослідження – субстанція ділтіазему. У якості розчинника застосовували воду дистильовану.

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

Методика кількісного визначення ділтіазему в субстанції

Точну наважку ділтіазему (0,0300–0,0560) вміщували в мірну колбу ємністю 200,0 мл, розчиняли в воді дистильованій і доводили цим же розчинником до позначки, перемішували. 2,00 мл отриманого розчину переносили в мірну колбу ємністю 25,00 мл та доводили водою дистильованою до позначки. Оптичну густину вимірювали на фоні розчинника при довжині хвилі 237 нм. Паралельно проводили визначення з 2,00 мл 0,0100% розчину порівняння ділтіазему, який готували шляхом розчинення в воді дистильованій точної наважки субстанції ділтіазему, що відповідала вимогам АНД. Розрахунок вмісту діючої

речовини у відсотках проводили за формулою 1:

$$C_{\%} = \frac{A \cdot C_0 \cdot 100,0 \cdot 25,00}{A_0 \cdot p \cdot 2,00 \cdot l}, \quad (1)$$

де A – оптична густина досліджуваного розчину;
 A_0 – оптична густина розчину порівняння;
 C_0 – концентрація спектрофотометрованого розчину порівняння ділтіазему (0,0016 г у 100 мл);
 p – наважка субстанції, г;
 l – товщина шару, см.

Результати та їх обговорення

УФ-спектр ділтіазему в воді дистильованій характеризується кількома смугами поглинання. Для розробки методики кількісного визначення обрано смугу, що спостерігається при 230–245 нм з максимумом поглинання при 237 нм (рис. 1).

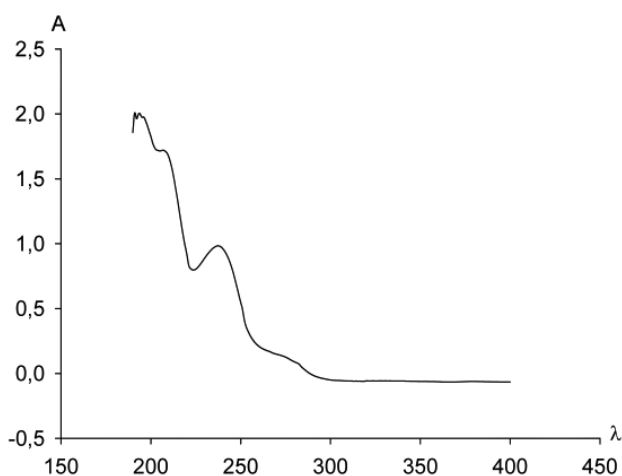


Рис. 1. УФ-спектр поглинання ділтіазему у воді дистильованій.

Валідація методики

Розроблену методику кількісного визначення ділтіазему валідовано відповідно до вимог ДФУ згідно до стандартизованої процедури валідації методик кількісного аналізу лікарських засобів методом стандарту [1,10].

Згідно з ДФУ [1], до кількісного вмісту ділтіазему в субстанції висуваються наступні вимоги: ділтіазему має бути від 98,5% до 101,0%. Виходячи з цього, можна визначити максимально припустиму невизначеність (Δ_{As}),

що дорівнює відносному допуску вмісту ($B\%$) аналізованої субстанції, тобто $\Delta_{As} = B = 1,0\%$ [1].

Лінійність і діапазон застосування методики

Лінійність визначали у межах 70–130% від номінальної концентрації ділтіазему. Розчини з відомою концентрацією отримували шляхом розведення 0,0500% розчину ділтіазему – 0,60; 0,70; 0,80; 0,90; 1,00; 1,10 мл вміщували в колби ємністю 25,00 мл, доводили водою дистильованою до позначки та вимірювали оптичну густину отриманих розчинів. На основі отриманих даних будували графік залежності оптичної густини від концентрації ділтіазему. Числові показники лінійної залежності розраховували за допомогою регресійного аналізу методом найменших квадратів. Знайдено: $y_i = 0,5110 x_i - 0,0074$. Отримані 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 у таблиці 1.

Отримані згідно з ДФУ числові показники лінійної залежності свідчать, що виконуються усі вимоги щодо параметрів лінійної залежності, тобто лінійність методики підтверджується в обраних діапазонах концентрацій (70–130%) (табл. 1).

Збіжність і правильність

З трьох наважок досліджуваної речовини готували 3 розчини, з кожним з яких проводили по 3 паралельні виміри при аналітичній довжині хвилі (всього 9). Абсорбцію розчину порівняння вимірювали паралельно. Вміст ділтіазему 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 з 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 з ДФУ, методика є точною на рівні збіжності, якщо односторонній інтервал окремого значення (Δ_x) не перевищує максимально припустиму невизначеність (Δ_{As}) – 1%. Виходячи з наведених у табл. 2 даних, запропонована методика є точною.

Таблиця 1

Числові показники лінійної залежності

Величина	Значення	Критерії	Висновок
$b \pm (s_b)$	0,5110 ± (0,0023)	–	–
$a \pm (s_a)$	–0,0074 ± (0,0039)	$a \leq \Delta a = t(95\%; 4) \cdot s_a = 0,0108$	відповідає
$s_{x,0}(\%)$	0,2187	$\leq \Delta_{As}(\%) / t(95\%; 4) = 0,3602$	відповідає
r	0,9999	$\geq 0,997$	відповідає

Таблиця 2

Визначення правильності та точності результатів кількісного визначення ділтіазему в субстанції

Лікарська речовина	\bar{X}	$ 100 - \bar{X} $	$RSD, \%$	Δ_x	$\Delta_{\bar{x}}$	Δ_{As}
Ділтіазем	100,27	0,27	0,3775	0,7020	0,2902	1,00

Розрахунок невизначеності пробопідготовки

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули (1)	Невизначеність, Δ%
Розчин порівняння		
1) Взяття наважки ділтіазему	ρ_o	0,02 мг/40,0 мг × 100 % = 0,05 %
2) Доведення до об'єму в мірній колбі ємністю 200 мл	200,00	0,075 %
3) Взяття аліквоти піпеткою 2 мл	2,00	0,5 %
4) Доведення до об'єму в мірній колбі ємністю 25 мл	25,00	0,23 %
Випробовуваний розчин		
1) Взяття наважки ділтіазему	ρ	0,02 мг/40,0 мг × 100 % = 0,05 %
2) Доведення до об'єму в мірній колбі ємністю 100 мл	200,00	0,075 %
3) Взяття аліквоти піпеткою 2 мл	2,00	0,5 %
4) Доведення до об'єму в мірній колбі ємністю 25 мл	25,00	0,23 %

Робасність

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

Прогноз повної невизначеності методики

Для підтвердження коректності методики при відтворюванні в іншій лабораторії необхідно дати прогноз повної невизначеності методики. Повна невизначеність результатів аналізу не має перевищувати максимально припустимую невизначеність результатів аналізу (Δ_{As}). Повна невизначеність, що прогнозується, розраховується за формулою:

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2}$$

де Δ_{SP} – невизначеність пробопідготовки;

Δ_{FAO} – прогнозована невизначеність вимірювань (кінцева аналітична операція) = 0,70% [11,12].

Для прогнозу невизначеності пробопідготовки методики розраховано похибки кожної операції для розчину порівняння та випробовуваного розчину, виходячи з роз-

рахункової формули кількісного визначення (1), а також загальну невизначеність (Δ_{SP}). Для цього використовували підхід і граничні невизначеності мірного посуду, описані в [13,14]. Дані наведено в *табл. 3*.

$$\Delta_{SP} = \sqrt{0,05^2 + 0,075^2 + 0,5^2 + 0,23^2 + 0,5^2 + 0,075^2 + 0,5^2 + 0,23^2} = 0,79\%$$

$$\Delta_{As} = \sqrt{0,79^2 + 0,70^2} = 1,0\% \leq \max \Delta_{As} = 1,0\%$$

Прогнозована повна невизначеність результатів для методики кількісного визначення не перевищує критичного значення $\max \Delta_{As} = 1,0\%$. Отже, методика даватиме коректні результати і в інших лабораторіях.

Висновки

Розроблено чутливу, економічну й експресну спектрофотометричну методику кількісного визначення ділтіазему в субстанції за власним поглинанням, яку валідовано згідно до стандартизованої процедури валідації методом стандарту. Доведено, що опрацьована методика відповідає вимогам ДФУ за основними валідаційними характеристиками, зокрема лінійністю, діапазоном застосування, збіжністю, правильністю та робасністю.

Список літератури

1. Державна Фармакопея України. – 1-е вид. – Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – Доповнення 2. – 2008. – С. 91–100, 423–424.
2. British Pharmacopoeia. – Her Majesty's Stationery Office. – London, 2009.
3. United States Pharmacopoeia 26. – USP Convention Inc. – Rockville, 2003.
4. Adsorptive stripping voltammetric determination of antihypertensive agent: diltiazem / M.A. Ghandour, E.A. Kasim, M.M Ali Azza et al. // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2001. – Vol. 25 (3–4). – P. 443–451.
5. Near-infrared FT-Raman spectroscopy as a rapid analytical tool for the determination of diltiazem hydrochloride in tablets / Vergote G.J., Vervaeck C., Remon J.P. et al. // Eur. J. Pharm. Sci. – 2002. – Vol. 16 (1–2). – P. 63–67.
6. Rahman N. Extractive spectrophotometric methods for determination of diltiazem HCl in pharmaceutical formulations using bromothymol blue, bromophenol blue and bromocresol green / Rahman N., Hejaz-Azmi S.N. // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2000. – Vol. 24 (1). – P. 33–41.
7. Rahman N. Spectrophotometric determination of diltiazem hydrochloride with sodium metavanadate / Rahman N., Hejaz-Azmi S.N. // Microchem. J. – 2000. – Vol. 65 (1). – P. 39–43.
8. Sanchez M.A. Liquid-liquid microextraction without phase separation in a multicommutated flow system for diltiazem determination in pharmaceuticals / Sanchez M.A., Rocha F.R.P. // Anal. Chim. Acta. – 2011. – Vol. 694 (1–2). – P. 95–99.
9. Devarajan P.V. High-performance thin-layer chromatographic determination of diltiazem hydrochloride as bulk drug and in pharmaceutical preparations / Devarajan P.V., Dhavse V.V. // J. Chromatogr. B. – Vol. 706 (2). – P. 362–366.
10. Державна Фармакопея України. – 1-е вид. – Харків: PIPEГ, 2001. – С. 58–68.
11. Державна Фармакопея України. – 1-е вид. – Харків: PIPEГ, 2001. – Доповнення 1. – 2004. – С. 187–214.
12. Стандартизована процедура валідації методик кількісного аналізу лікарських препаратів методом стандарту / А.И. Гризодуб, Д.А. Леонтьев, Н.В. Денисенко, Ю.В. Подпрудников // Фармаком. – 2004. – №3. – С. 1–15.
13. Воспроизводимость фармакопейных спектрофотометрических методик количественного определения лекарственных средств в различных лабораториях / А.И. Гризодуб, Н.Н. Зволинская, Н.Н. Архипова и др. // Фармаком. – 2004. – №2. – С. 1–16.
14. Гризодуб А.И. Валідація спектрофотометрических методик количественного анализа лекарственных средств в соответствии с требованиями ГФУ // Фармаком. – 2002. – №3. – С. 42–50.

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.

Надійшла в редакцію 29.12.2011 р.