

**ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК ЯКІСНОГО ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ
ПІРИДОКСИНУ ГІДРОХЛОРИДУ В РОЗЧИНІ ДЛЯ ПИТТЯ “СЕДАВІТ”**

Проведено валідацію аналітичних методик ідентифікації та кількісного визначення піридоксину гідрохлориду в розчині для пиття “Седавіт” за стандартизованою процедурою, що відповідає вимогам ДФУ. При валідації методики ідентифікації піридоксину гідрохлориду було вивчено специфічність та достовірність відтворення методики. Для методики кількісного визначення розглядали основні валідаційні характеристики: діапазон застосування, специфічність, правильність, збіжність, лінійність, робастність, внутрішньолaboratorну прецизійність, що дозволило визначити придатність методики для використання у фармацевтичному аналізі.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: метод абсорбційної спектрофотометрії, валідація аналітичної методики, піридоксину гідрохлорид.

ВСТУП. Використання методу абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій (УФ) і видимій ділянках для ідентифікації та кількісного визначення піридоксину гідрохлориду в комплексному препараті рослинного походження ускладнене знаходженням його максимуму поглинання (при рН від 4,00 до 7,00 – від 220 до 350 нм) у тій самій ділянці, що і максимуми поглинання інших компонентів, які входять до складу рослинного препарату (поліфенольні сполуки, нікотинамід) [7, 8]. Дане питання можна вирішити шляхом проведення специфічної колориметричної реакції [4]. В результаті взаємодії солей діазонію з піридоксину гідрохлоридом у лужному середовищі утворюються азобарвники, сполучення відбувається в пара-положенні до гідроксильної групи. При додаванні до азобарвників піридоксину іонів деяких металів (цинку, ртуті, міді, кадмію, талію) утворюються комплексні сполуки у співвідношенні 1:1 азобарвник-метал, забарвлені у червоний колір. Коли як реактиви використовують діазосульфокислоту та цинку сульфат, отриманій комплексній сполуці властиві специфічні спектральні характеристики з максимумом поглинання (520 ± 2) нм, що дозволяє проводити аналіз за присутності інших компонентів.

На основі літературних даних експериментальним шляхом було підібрано оптимальні умови перебігу реакції і запропоновано методики ідентифікації та кількісного визначення

піридоксину гідрохлориду в досліджуваній лікарській формі. Метою даної роботи були валідація запропонованих методик ідентифікації та кількісного визначення піридоксину гідрохлориду в комплексному препараті рослинного походження “Седавіт” та визначення їх основних метрологічних характеристик.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Для виконання дослідів використовували субстанцію піридоксину гідрохлориду, яка відповідає вимогам BP 98, USP 24, ДФУ, мірний посуд класу А, прилади: аналітичні ваги AB 204 S/A METTLER TOLEDO, спектрофотометр “SPECORD 200”, центрифугу ОПН-12.

Методика якісного визначення. Спектр поглинання випробовуваного розчину, приготованого і виміряного в умовах кількісного визначення піридоксину гідрохлориду, в ділянці від 400 до 700 нм повинен мати максимум при довжині хвилі (520 ± 2) нм.

Методика кількісного визначення. 5 мл препарату поміщають у центрифужну пробірку, додають 20 мл води, 1,5 мл розчину свинцю ацетату, перемішують і центрифугують при 5000 об./хв протягом 5 хв. Центрифугат зливають у мірну колбу місткістю 50,0 мл. До осаду в центрифужній пробірці додають 20 мл води, перемішують і центрифугують при 5000 об./хв протягом 5 хв. Центрифугат зливають у ту ж мірну колбу, додають 1 мл розчину натрію сульфату, доводять об’єм розчину до мітки і перемішують. Через 20 хв розчин фільтрують че-

рез паперовий фільтр “біла стрічка”, відкидаючи перші 10 мл фільтрату (розчин А).

2 мл розчину А поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл, додають 3 мл розчину натрію ацетату, 2 мл діазореактиву і перемішують. Через 5 хв додають 10 мл спирту 96 %, 2 мл 0,1 % розчину цинку сульфату, доводять об'єм розчину спиртом 96 % до мітки і перемішують.

Через 30 хв вимірюють оптичну густину отриманого розчину на спектрофотометрі при довжині хвилі 520 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи як розчин порівняння розчин, приготовлений аналогічно випробовуваному, де замість 2 мл 0,1 % розчину цинку сульфату додають 2 мл води.

Паралельно вимірюють оптичну густину розчину, що містить 2 мл розчину робочого стандартного зразка (РСЗ) піридоксину гідрохлориду, що приготовлений аналогічно випробовуваному розчину, починаючи зі слів “... поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл”, використовуючи як розчин порівняння розчин, приготовлений аналогічно розчину РСЗ піридоксину гідрохлориду, де замість 2 мл 0,1 % розчину цинку сульфату додають 2 мл води.

Вміст піридоксину гідрохлориду в 1 мл препарату в грамах обчислюють за формулою:

$$X_{\text{г}} = \frac{A_i \cdot m_{\text{РСЗ}} \cdot 50 \cdot 2 \cdot 25 \cdot 2}{A_{\text{РСЗ}} \cdot 5 \cdot 50 \cdot 2 \cdot 50 \cdot 25} = \frac{A_i \cdot m_{\text{РСЗ}} \cdot 0,008}{A_{\text{РСЗ}}},$$

де A_i – оптична густина випробовуваного розчину;

$A_{\text{РСЗ}}$ – оптична густина розчину робочого стандартного зразка;

$m_{\text{РСЗ}}$ – маса наважки робочого стандартного зразка (г).

Приготування розчину РСЗ піридоксину гідрохлориду. Близько 0,07 г (т.н.) піридоксину гідрохлориду поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняють у 20 мл води, доводять об'єм розчину водою до мітки і перемішують.

Приготування діазореактиву. В мірну колбу місткістю 50 мл поміщають 5 мл 1 % розчину стрептоциду в 1 % кислоті хлористоводневій, додають 5 мл 1 % розчину натрію нітриту і перемішують. Через 5 хв додають 0,15 мл 20 % розчину сечовини, перемішують розчин до припинення виділення бульбашок азоту, доводять об'єм розчину водою до мітки і перемішують.

Приготування 1 % розчину стрептоциду в 1 % розчині кислоти хлористоводневої. 1 г стрептоциду поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, додають 12 мл кислоти хлористоводневої розведеної, розчиняють наважку, доводять об'єм розчину водою до мітки і перемішують.

Приготування 1 % розчину натрію нітриту. 1 г натрію нітриту поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють у 60 мл води, доводять об'єм розчину водою до мітки і перемішують.

Приготування 0,1 % розчину цинку сульфату. 0,05 г цинку сульфату поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняють у 20 мл води, доводять об'єм розчину водою до мітки і перемішують.

Приготування 20 % розчину сечовини. 10 г сечовини поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняють у 30 мл води, доводять об'єм розчину водою до мітки і перемішують.

Для валідації методик використовували модельні розчини препарату з вмістом піридоксину гідрохлориду 0,0420, 0,0510, 0,0600, 0,0690, 0,0780 г у 100 мл розчину, що відповідає 70, 85, 100, 115, 130 % відносно вмісту піридоксину гідрохлориду в препараті [5].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. З метою підтвердження специфічності методики ідентифікації піридоксину гідрохлориду під час валідації було порівняно спектри поглинання модельного розчину, розчину порівняння та розчину робочого стандартного зразка піридоксину гідрохлориду у видимій та УФ ділянках. Спектр поглинання випробовуваного розчину (рис. 1) має максимум поглинання за тієї ж довжини хвилі, що і розчин РСЗ, інші компоненти лікарської форми не впливають на результат аналізу (рис. 2), тобто методика характеризується достатньою специфічністю.

Для того, щоб дослідити відтворюваність та ймовірність виявлення піридоксину гідрохлориду, за даною методикою було проведено дослід для 5 точок діапазону застосування (70–130 %) зі стандартизованою процедурою валідації методик ідентифікації [3]. Досліджувану методику відтворено в умовах трьох різних лабораторій у різні дні на модельних розчинах (табл. 1), отриманий результат порівнювали з результатами дослідів РСЗ та розчину порівняння.

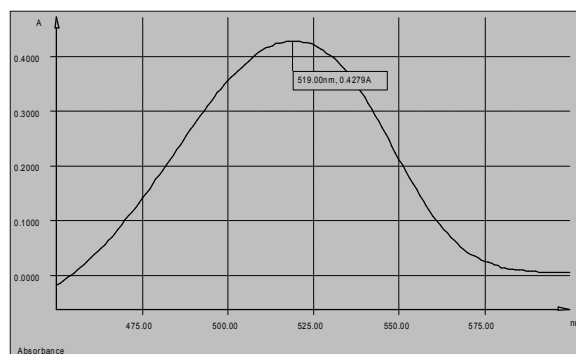


Рис. 1. Спектр поглинання аналітичного розчину.

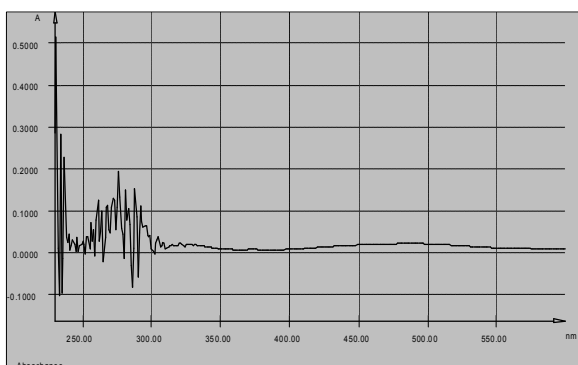


Рис. 2. Спектр поглинання розчину порівняння.

Експериментальні дані підтверджують, що методика дозволяє ідентифікувати піридоксину гідрохлорид у діапазоні застосування 70–130 %, дослід, проведений у трьох лабораторіях, характеризується 100 % імовірністю виявлення.

Перевагою методики можна вважати можливість використання отриманих значень оптичної густини для кількісного визначення піридоксину гідрохлориду, що скорочує час проведення хімічного аналізу.

Перед проведенням валідації методики кількісного визначення піридоксину гідрохлориду розраховували критерії прийнятності

валідаційних характеристик методики, беручи до уваги допуски вмісту піридоксину гідрохлориду ± 15 % (табл. 2), стабільність аналітичного розчину в часі (табл. 3) та специфічність (табл. 4) [1].

Визначали стабільність аналітичного розчину в часі протягом 30–70 хв після додавання розчину цинку сульфату. За результатами експерименту встановлено, що стійке забарвлення утворюється через 30 хв після додавання реагенту. Результати дослідів наведено в таблиці 3. Вивчення стійкості оптичної густини розчинів, які аналізують, показало, що найбільш інтенсивне та стабільне поглинання утворюється в інтервалі часу 30–40 хв.

Специфічність методики оцінювали за порівнянням середніх значень оптичної густини розчину порівняння та розчину стандартного зразка: $A_{\text{blank}} = 0,0062$; $A_{\text{st}} = 0,4279$. Систематична похибка, яку вносять інші компоненти, склала:

$$\delta_{\text{exc}} = \frac{100 \cdot 0,0062}{0,4279} = 1,45 \%$$

Отже, нерівність $\delta_{\text{exc}} \leq \delta_{\text{max}}$, $1,45 \leq 1,54$ % виконується, тому фонове поглинання є незначущим і методика характеризується достатньою специфічністю.

Таблиця 1 – Ідентифікація піридоксину гідрохлориду методом спектрофотометрії

Модельний розчин, %	Лаб. 1			Лаб. 2			Лаб. 3			$P(C_k)$	R, %
	n_k	α_1	$P(C_k)$	n_k	α_1	$P(C_k)$	n_k	α_1	$P(C_k)$		
70	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	100
85	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	100
100	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	100
115	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	100
130	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	100
PC3	20	1	0	20	1	0	20	1	0	0	0
розчин порівн.	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	100

Таблиця 2 – Критерії прийнятності валідаційних характеристик

Критерії прийнятності	Величини критичних значень
Вміст піридоксину гідрохлориду, г	0,051–0,069
Допуски вмісту – B, %	± 15
Повна невизначеність методики – $\max \Delta_{A_{st}}$, %	4,8
Максимальна систематична похибка – δ_{max} , %	1,54
Залишкове стандартне відхилення – S_0 , %	2,7105
Індекс кореляції – R_c	0,9924
Вільний член – a	5,12

Таблиця 3 – Стабільність досліджуваного розчину в часі

Час дослідження стабільності, хв					середнє	RSD _t , %	Δt , %	δ_{max} , %
30	40	50	60	70				
0,409	0,411	0,412	0,413	0,414				
0,410	0,412	0,412	0,413	0,413				
0,409	0,411	0,413	0,412	0,414				
0,4093	0,4113	0,4123	0,4127	0,4138	0,4118	0,5388	0,9838	1,024

Валідацію аналітичної методики кількісного визначення піридоксину гідрохлориду в розчині для пиття “Седавіт” проводили за стандартизованою процедурою у діапазоні застосування 70–130 % від номінальної концентрації [6]. При вивченні методики кількісного визначення було встановлено такі валідаційні характеристики, як: правильність, збіжність, лінійність та внутрішньолабораторна прецизійність (табл. 4) [1, 2, 6].

Таблиця 4 – Валідаційні характеристики методики спектрофотометричного визначення піридоксину гідрохлориду

Валід. характеристики	Лаб. 1	Лаб. 2
Вивчення правильності та збіжності		
Z, %	98,59	99,19
S _z , %	0,46	0,56
Δ _z , %	0,81	0,99
δ, %	1,41	0,81
Вивчення лінійності		
b	0,9724	0,9893
S _b	0,0040	0,0050
a	1,2950	-0,2568
S _a	0,4092	0,5073
S _o	0,3288	0,4077
r	0,9999	0,9998
Вивчення внутрішньолабораторної прецизійності		
Z _{intra} , %	98,63	
SD _z , %	0,44	
Об'єднане Δ _z , %	1,37	

Валідаційні характеристики методики оцінювали за результатами аналізу 15 випробувань для п'яти різних концентрацій, відтворюваність визначали у різні дні та різними ана-

літиками, в умовах однієї лабораторії. Одержані результати лінійності свідчать про виконання вимог до параметрів $a \leq 5,12$, $r \leq 0,9924$, $S_o \leq 2,7105$, лінійність методик підтверджується на всьому діапазоні визначення (70–130 %). За результатами внутрішньолабораторного дослідження, середнє значення та відхилення одичного випробування для методики кількісного визначення склали $Z_{intra} \pm \Delta_{intra} = 98,63 \pm 1,37$. Величина Δ_{intra} не перевищувала максимально допустимого невизначеності аналітичної методики $\Delta_{intra} \leq 4,8$ %, а загальна систематична похибка та систематична похибка окремого дослідження 1,41 %, 0,81 % не перевищували критичного значення $\delta_{max} = 1,54$ %.

ВИСНОВКИ. 1. При валідації методики ідентифікації піридоксину гідрохлориду в препараті “Седавіт” методом абсорбційної спектрофотометрії встановлено, що ймовірність виявлення піридоксину гідрохлориду складає 1,0 на всьому діапазоні застосування (70–130 %); ідентифікація піридоксину гідрохлориду за присутності інших компонентів лікарського засобу характеризується 100 % достовірністю відтворення результату.

2. За отриманими даними валідаційних характеристик (діапазон застосування, специфічність, правильність, збіжність, лінійність, робастність, внутрішньолабораторна прецизійність), спектрофотометрична методика кількісного визначення піридоксину гідрохлориду в розчині для пиття “Седавіт” відповідає вимогам ДФУ, може бути коректно відтворена в умовах лабораторії з аналізу якості лікарських засобів та може бути внесена до МКЯ.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Державна Фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. – Доповнення 2. – Харків : РІРЕГ, 2008. – 608 с.
2. Евтифеева О. А. Стандартизованная процедура валидации методик количественного определения экстерпоральных лекарственных средств в условиях аптек и лабораторий по контролю качества / О. А. Евтифеева, В. А. Георгиянц // Фармаком. – 2007. – № 1. – С. 69–81.
3. Евтифеева О. А. Стандартизация подходов до оценки химических методов идентификации речовин, які входять до складу екстерпоральних лікарських препаратів / О. А. Евтифеева // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. – 2010. – № 1. – С. 19–24.

4. Мелентьева Г. А. Фармацевтическая химия / Г. А. Мелентьева, Л. А. Антонова. – М. : Медицина, 1985. – 480 с.
5. Обґрунтування складу лікарського засобу седативної дії / С. В. Гарна, А. І. Русинов, В. А. Георгіянц [та ін.] // Актуальні питання фармацевтичної науки та практики. – 2010. – Вип. XXIII, № 2. – С.13–16.
6. Стандартизованная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта / А. И. Гризодуб, Д. А. Леонтьев, Н. В. Денисенко, Ю. В. Подпругников // Фармаком. – 2004. – № 3. – С. 3–17.
7. Heba Abdine H. Simultaneous determination of melatonin-pyridoxine combination in tablets by zero-crossing derivative spectrophotometry and spec-

trofluorimetry // Heba H. Abdine, Azza A. Gazy, Mohamed H. Abdel-Hay // Journal of Pharmaceutical and Bio-medical Analysis. – 1998. – 17, Iss. 3. – P. 379–386.

8. Simultaneous Determination of Codeine and Pyridoxine in Pharmaceutical Preparations by First-

Derivative Spectrofluorimetry / Antonio Molina-Diaz, Natividad Ramos-Martos, Alberto Navalon, Luis F. Capitan-Vallvey // Journal of AOAC INTERNATIONAL. – 2002. – 85, Iss: 4. – P. 861–868.

С. В. Гарная, А. А. Здорик, В. А. Георгиянц
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПИРИДОКСИНА ГИДРОХЛОРИДА В РАСТВОРЕ ДЛЯ ПИТЬЯ “СЕДАВИТ”

Резюме

Проведена валидация аналитических методик идентификации и количественного определения пиридоксина гидрохлорида в растворе для питья “Седавит” по стандартизированной процедуре, которая соответствует требованиям ГФУ. При валидации методики идентификации пиридоксина гидрохлорида были изучены специфичность и достоверность воспроизведения методики. Для методики количественного определения рассматривали основные валидационные характеристики: диапазон применения, специфичность, правильность, сходимость, линейность, робастность, внутрилабораторную прецизионность, что позволило определить пригодность методики для использования в фармацевтическом анализе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: метод абсорбционной спектрофотометрии, валидация аналитической методики, пиридоксина гидрохлорид.

S. V. Harna, O. A. Zdoryk, V. A. Heorhiyants
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

THE VALIDATION OF THE QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION METHODS OF PYRIDOXINE HYDROCHLORIDE IN THE SOLUTION FOR DRINK “SEDAVITUM”

Summary

The validation of analytical identification and assay methods of pyridoxine hydrochloride in the solution for drink “Sedavitum” was conducted according to the standardized procedure which corresponds to the requirements of the SPU. Specificity and reliability of reproduction was studied during the validation of the identification method of a pyridoxine hydrochloride. The basic validation parameters: range of use, specificity, correctness, accuracy, linearity, robustness, intralaboratory precision were examined for the assay method that has allowed to define suitability of a method for usage in the pharmaceutical analysis.

KEY WORDS: absorption spectrophotometry, validation of analytical methods, pyridoxine hydrochloride.

Отримано 02.06.11

Адреса для листування: С. В. Гарна, Леніна, 1, кв. 112, Харків, 61166, Україна.