УДК: 615.22:546.41].015.25.07:54.062

Ю.В.Тимошик, В.В.Петренко

РОЗРОБКА МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ВЕРАПАМІЛА ГІДРОХЛОРИДА ПО ЙОГО РЕАКЦІЇ З НІНГІДРИНОМ ТА ЇЇ ВАЛІДАЦІЙНА ХАРАКТЕРИСТИКА

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: *верапаміла гідрохлорид, нінгідрин, спектрофотометрія, кількісне визначення, валідація аналітичної методики.*

Ключевые слова: *верапамила гидрохлорид, нингидрин, спектрофотометрия, количественное определение, валидация аналитической методики.*

Key words: *verapamilum hydrochloridum, ningidrinum, spectrophotometric method, quantitative determination, validation of the analytical method.*

Розроблено нову та просту у виконанні методика кількісного визначення верапамілу гідрохлориду в таблетках на основі реакції з нінгідрином в середовищі диметилформаміду. Здійснено валідацію методики відповідно до вимог ДФУ з розгляданням таких параметрів як: діапазон застосування, лінійність, специфічність, робасність та точність.

Разработана новая, простая в выполнении методика количественного определения верапамила гидрохлорида в таблетках на основе реакции с нингидрином в среде диметилформамида. Приведена статистически обоснованная процедура валидации, которую осуществляли по схеме согласно ГФУ с рассмотрением таких параметров как: диапазон применения, специфичность, линейность, робасность, сходимость, правильность.

The method of quantitative spectrophotometric identification of Verapamilum hydrochloridum tablets is worked out. This method is based on the interaction preparation reaction with ningidrinum. This method is sufficient sensitive. Statistical motivated procedure of the validation is brought. The validation of the analytical methods held at scheme, which is specified in SPU; the following parameters were considered: range of application, specificity, linearity, exactness, accuracy, robustness, convergence of the results.

Верапаміла гідрохлорид – один із представників антагоністів кальцію. Даний лікарський засіб є селективним блокатором кальцієвих каналів L типу I класу, з переважною дією на серце. Препарат справляє антиангінальну дію, а також належить до антиаритмічних препаратів IV класу [5,6]. За хімічною будовою верапаміла гідрохлорид відносять до похідних фенілалкіламінів: (2RS) – 2 – (3,4 – діметоксифеніл) – 5 - [[2 – (3,4 – діметоксифеніл) етил] (метил) аміно] – 2 – (1 – метил етил) пентаннітрилу гідрохлорид [3,4].

МЕТОЮ нашої **РОБОТИ** була розробка нової та простої у виконанні методики визначення верапамілу гідрохлориду в готовій лікарській формі – таблетки, згідно вимогам ДФУ з її повною валідаційною характеристикою, оскільки відомі методи аналізу характеризуються складністю у виконанні і потребують дорогих реактивів [7,8].

Нами були вивчені умови реакції верапамілу гідрохлориду з нінгідрином і запропонований метод спектрофотометрії у видимій ділянці спектру.

Нінгідрин – похідне індандіону – 1,3, який широко використовується для колориметричного та хроматографічного визначення амінокислот, амінів та вітамінів [3].

Розробляючи раціональну методику кількісного аналізу, було визначено кордони концентрацій верапамілу гідрохлориду в межах яких спостерігається підпорядкування світловбирання закону Бера, які становлять 7,0 – 11,2 мг/100.

Кількісне визначення верапамілу гідрохлориду в таблетках

Таблетки, що аналізувалися, розтирали у порошок. Наважку таблеткової маси, яка містила 0,02 – 0,025 г верапамілу гідрохлориду, розчиняли в диметилформаміді (ДМФА) в колбі ємністю 50 мл, доводили до позначки цим же розчинником та перемішували. 5 мл даного розчину з 3 мл 5 % розчину нінгідрину нагрівали в киплячому водяному нагрівнику 7 хвилин. Отриманий розчин охолоджували, переносили у мірну колбу ємністю 25 мл і доводили ДМФА до позначки та перемішували.

Паралельно проводили дослід з розчином порівняння верапамілу гідрохлориду і компенсаційним розчином, який не вміщував об'єкт дослідження.

Розчин порівняння. 0,035 г (точна наважка) субстанції верапамілу гідрохлориду вміщували в мірну колбу ємністю 50 мл, розчиняли в ДМФА, ретельно перемішуючи, доводили цим же розчинником до позначки. 3 мл одержаного розчину переносили в пробірку, додавали 2 мл ДМФА та 3 мл 5% розчину нінгідрину, нагрівали в киплячому водяному нагрівнику 7 хвилин, охолоджували та переносили у мірну колбу на 25 мл і доводили ДМФА до позначки.

Розрахунок вмісту верапамілу гідрохлориду в грамах проводили за формулою:

$$X = \frac{A \cdot Co \cdot Mcp \cdot 50 \cdot 25}{Ao \cdot a \cdot l \cdot 5 \cdot 100}$$

Де А – оптична густина досліджуваного розчину;

A_0 – оптична густина стандартного розчину;

C_0 – концентрація стандартного розчину (0,0084г/100мл);

$M_{ср}$ – середня маса таблеток, г;

а – наважка таблеткової маси, г;

l – товщина шару, см

Результати кількісного визначення верапамілу гідрохлориду в таблетках наведені у *табл.1*

© В.ᵘ.´ МПΣέ МЄ, ᵘ.ᵘ. єІ ХУІ РΞΣ, 2008

Таблиця 1

Лікарська форма	Проба, що аналізується	Знайдено, г в перерахунку на ср. масу таблетки	Вміст верапамілу г/хл згідно ДФУ
Таблетки«Верапаміл - Дарниця», вміст верапамілу гідрохлориду 0,08 г Серія 41007	Наважка таблеткової маси, 0,0654г	0,0732	0,072 – 0,088г
	Наважка таблеткової маси, 0,0674г	0,0799	
	Наважка таблеткової маси, 0,0697г	0,0817	
	Наважка таблеткової маси, 0,0658г	0,0815	
	Наважка таблеткової маси, 0,0775г	0,0848	
	Наважка таблеткової маси, 0,0706г	0,0797	

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Діапазон застосування (range) аналітичної методики. Нами був обраний діапазон застосування від 80% до 120%, згідно методик кількісного визначення за ДФУ [2].

Невизначеність аналітичної методики. Розрахунок критеріїв прийнятності методики аналізу: максимально допустимої повної невизначеності - maxΔas = 3,2%, яка пов'язана з симетричними допусками вмісту ±10% [1,2], максимальної систематичної похибки – max δ = 1,02, вклад плацебо в сумарну величину фонового поглинання незначущий, критичне значення для остаточного стандартного відхилення RSD_o% = maxΔas/t(95, n-2) = 1,69, індексу кореляції R_c = 0,99236 і практичної невизначеності вільного члену лінійної залежності – a = 5,1.

Специфічність. Для підтвердження специфічності методики розраховували відносну систематичну похибку, тобто вклад плацебо. Для цього тричі вимірювали оптичну густину (A_{blank}) розчину плацебо з вийманням кювети та оптичну густину (A_{st}) розчину порівняння. Знайдені середні значення A_{blank} = 0,00017 і A_{st} = 0,2815 свідчать, що вклад плацебо в сумарне поглинання препарату становить 0,06%. З нерівності 0,06<0,033•10 = 0,33 видно, що вклад плацебо є незначущим.

Лінійність. Для визначення лінійності було одержано три значення оптичних густин для розчину порівняння та 27 значень оптичних густин модельних розчинів. Розраховували відношення середніх значень оптичних густин для кожного із 9 розчинів до середнього значення оптичної густини розчину порівняння, одержуючи величини $X_i = C_i/C_{st} \cdot 100\%$ і $Y_i = A_i/A_{st} \cdot 100\%$. Працювали в нормалізованих координатах, подаючи концентрації та аналітичний сигнал у відсотках до номінальних значень. Визначали також величину $Z = 100 \cdot (Y_i/X_i)$, яка є знайденою концентрацією у відсотках до введеної. Результати статистичного розрахунку лінійної залежності наведені у *табл. 2.*

Таблиця 2

Метрологічні характеристики лінійної залежності

Величина	Значення	Критерії для допуску, число точок 9	Висновок (відповідає чи ні)
b	1.0048	-	-
S_b	0.0046	⩽ -	-
a	- 0.343	$1.8946 \cdot S_a$ = 0.8867	відповідає
S_a	0.468	⩽ -	-
S_r	0.1796	⩾ 1.69	-
r	0.9999	0.99236	відповідає

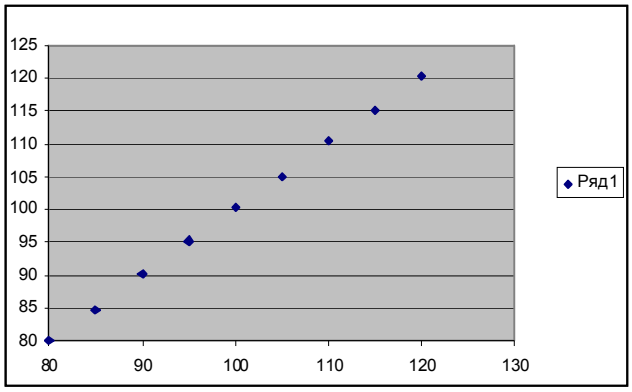

Рис.1 Лінійна залежність оптичної густини від концентрації верапамілу гідрохлориду в нормалізованих координатах

Лінійність методики підтверджується в усьому діапазоні концентрацій (80 – 120)%.

Стабільність. Перевірку стабільності аналітичного розчину (приготовленого за вищенаведеною методикою) проводили протягом години. Отримані результати наведені у *табл. 3*. Як видно із *табл.3* $\Delta t \leqslant \max\delta$ = 1.02%, отже розчини стабільні на протязі 1 години.

Таблиця 3

Результати вивчення стабільності досліджуваного розчину та розчину порівняння

№	t,хв, A_i							Середнє	RSD_t %	?$_t$%	max δ,%
	0	10	20	30	40	50	60				
1	0.2902	0.2890	0.2880	0.2867	0.2788	0.2783	0.2782	0.2842	0.0192	0.01	1.02
2	0.2901	0.2888	0.2867	0.2849	0.2815	0.2783	0.2745	0.2835	0.0202	0.01	

© В.ᵘ . ´ МПΣέ МЄ, ᵘ .ᵘ . єІ XYI РΞΣ, 2008

Збіжність та правильність досліджуваної методики визначали одночасно. Оптичну густину всіх 9 розчинів вимірювали при аналітичній довжині хвилі і встановлювали відношення знайденої концентрації до введеної у відсотках (*табл.4)*.

Таблиця 4

Результати перевірки правильності та збіжності

№ модельного розчину	Наважки верапаміла ,мг (m_{st} = 0.0350)	Введено у % до концентрації розчину порівняння ($X_{факт}$,%)	Оптичні густини A_i	Знайдено у % до концентрації розчину порівняння (Y_i%)	Знайдено у % до введеного Z_i=100(Y_i/X_i)
1	0.0438	80	0.2252	80	100
2	0.0466	85	0.2389	84.87	99.85
3	0.0494	90	0.2540	90.23	100.26
4	0.0519	95	0.2680	95.20	100.21
5	0.0547	100	0.2822	100.2	100.2
6	0.0575	105	0.2957	105.0	100
7	0.0603	110	0.3110	110.5	100.5
8	0.0628	115	0.3241	115.1	100.1
9	0.0656	120	0.3382	120.1	100.1
Середнє Z_i					100.14
Відносне стандартне відхилення, S_z%					0.19
Відносний довірчий інтервал Δ_z% = t(95%, 8)·S_z = 1.860·S_z					0.35
Критичне значення для збіжності результатів ?%					3.2
Систематична похибка δ = |Z - 100|					0.14
Критерій невизначеності систематичної похибки δ Δ</3 = 0.35/3 = 0.12					Виконується
Загальний висновок щодо методики:					коректна

Із *табл.4* видно, що методика аналізу характеризується достатньою збіжністю та правильністю у всьому діапазоні концентрацій (80 – 120)%.

Прогноз повної невизначеності методики.

Розрахунки проводили, використовуючи формулу АНД, а також підхід і невизначеності мірного посуду.

Невизначеність кінцевої аналітичної операції у нашому випадку становить Δ_{FAO} = 0.70% [1], невизначеність пробопідготовки за ДФУ [2] Δ_{Sp} = 1,14% тобто Δ_{As} = 1,34%. Δ_{As} = 1.34<max Δ_{As} = 3.2%.

Як видно, повна невизначеність результатів не перевищує критичного значення 3.2%.

ВИСНОВКИ

1. Розроблена методика кількісного визначення верапамілу гідрохлориду у таблетках на основі реакції з нінгідрином
2. Здійснено валідацію методики кількісного визначення верапамілу гідрохлориду відповідно до вимог ДФУ
3. Встановлено, що методика валідована та відповідає вимогам ДФУ за специфічністю, лінійністю, точністю та робасністю

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Гризодуб А. И., Леонтьев Д.А., Денисенко Н.В. и др.* // Фармаком. – 2004. - №3. – С. 1-15.
2. Державна фармакопея України: Доп.1. – Х.: РІРЕГ, 2004. – С. 5 – 100.
3. *Лурье Ю.Ю.* Справочник по аналитической химии. – 6-е изд., перераб. и доп. – М.: химия, 1989. – 448с.
4. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Т.1. – Москва Новая волна», 2000. – 417с.
5. *Метелица Н.В.* Справочник по клинической фармакологии сердечно-сосудистой системы. – 2-е изд. – М.: Бином. – СПб.: Невский диалект, 2002. – 926с.
6. *Харкевич Д.А.* Фармакология. – 8-е узд., перераб.,доп. и исправл. – М.:ГЕОТАР-МЕД», 2004. – 298с.
7. *Nafisur Rahman, Md Nasrul Hoda* // Anal Bional Chem. - 2002.-Vol. 374. -P. 484-489.
8. *Rahman N, Hejaz Azmi SN* // Farmaco. - 2004.-Vol.59 (7).-P. 529-536.

Відомості про авторів:

Тимошик Ю.В., аспірант кафедри аналітичної кафедри ЗДМУ;

Петренко В.В., д.фарм.н., професор, завідувач кафедри аналітичної хімії ЗДМУ.

Адреса для листування:

Тимошик Юлія Василівна, 69035, м. Запоріжжя, пр.Маяковського, 26, ЗДМУ, кафедра аналітичної хімії. Тел.: (0612) 34-21-81

© В.ᵘ . ´ МПΣ é Ме, ᵘ .ᵘ . c I XYI P=Σ, 2008