

УДК 615.225.074:543.544.5.068.7.062:54.052

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛИЗИНОПРИЛА ДИГИДРАТА В ГРАНУЛАХ

Бабьяк А. В., Компанцева Е. В.

Пятигорский филиал государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Пятигорск, Россия (357532, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11), e-mail: annav.babyak@gmail.com.

В настоящей статье описаны простые и чувствительные методы определения лизиноприла дигидрата в фармацевтической композиции гипотензивного действия, куда он входит в составе гранул. Цель представленной работы заключается в оценке аналитических методик, разработанных для количественного определения лизиноприла в гранулах. Валидация методик была проведена по параметрам: специфичность, линейность, правильность и повторяемость. Для количественного анализа исследуемого вещества использовали методы УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ. Метод УФ-спектрофотометрии основан на образовании окрашенного продукта по реакции лизиноприла с нингидрином в присутствии натрия карбоната с максимумом поглощения при 565 нм. Установлено, что методики являются специфичными, линейными в аналитической области, правильными и прецизионными. По воспроизводимости метод ВЭЖХ значительно превосходит метод УФ-спектрофотометрию.

Ключевые слова: лизиноприла дигидрат, ВЭЖХ, УФ-спектрофотометрия, валидация.

VALIDATION METHODS FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF LISINOPRIL DIHYDRATE IN GRANULES

Babyak A. V., Kompanceva E. V.

Pyatigorsky branch of the State Budgetary Educational Establishment of Higher Professional Education «Volgograd State Medical University» of the Ministry of Public Health Services of the Russian Federation, Pyatigorsk, Russia (357532, Pyatigorsk, pr. Kalinina, 11), e-mail: annav.babyak@gmail.com.

The article deals with the problem of simple and sensitive methods for the assay of lisinopril in hypotensive pharmaceutical composition, where lisinopril is entered as an active part of granules. The purpose is to evaluate the analytical methods developed for the quantitative determination of lisinopril in granules. Validation procedures were performed on parameters: specificity, linearity, trueness and precision. Quantitative analysis of the substance was carried out by UV-Spectrophotometry and HPLC. Spectrophotometric determination of lisinopril is based on the formation of the colour product with ninhydrin in the presence of sodium carbonate with an absorption maximum at 565 nm. It is found that the techniques are specific, linear in the analytical field, accurate and precise. The precision HPLC method far exceeds the UV-spectrophotometry.

Keywords: lisinopril dihydrate, HPLC, UV-spectrophotometry, validation.

Введение

Лизиноприл широко используется для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы, связанных с повышенным артериальным давлением, как в виде монотерапии, так и в составе комбинированной антигипертензивной терапии. Фиксированные комбинации лекарственных средств (ЛС) уже давно нашли отражение в международных и отечественных рекомендациях по лечению артериальной гипертензии [3,6], однако российский рынок фармацевтических препаратов не отвечает потребностям населения в комбинированных гипотензивных ЛС. В связи с этим перспективным является разработка новой гипотензивной комбинации, где одним из действующих веществ является лизиноприла дигидрат.

В ходе проведенных исследований нами установлено, что в состав сложной лекарственной формы лизиноприл следует вводить в виде гранул. Определение количества вещества лизиноприла предложено проводить методами УФ-спектрофотометрией и ВЭЖХ.

Цель работы заключается в оценке адекватности аналитических методик, предложенных для количественного анализа лизиноприла дигидрата в гранулах.

В статье представлены результаты валидации разработанных методик по параметрам: специфичность, линейность, правильность и повторяемость.

Материалы и методы

В работе использовали приборы: спектрофотометр СФ 2000, жидкостный хроматограф Aligent 1260 Infinity с колонкой Luna 5u длиной 25 мм с сорбентом Силасорб С₁₈, рН - метр ионометр 410, аналитические весы марки Т-А-13 .

Растворы стандартных образцов (СО) лизиноприла дигидрата (ФС 42-0252-07) готовили в концентрации 0,04 мг/мл (для УФ-спектрофотометрии) и 0,01 мг/мл (для ВЭЖХ).

Для приготовления модельной смеси гранул лизиноприла 0,17 г кальция гидрофосфата дигидрата смешивали с 0,01 г Plasdone К-30 (в виде 20 % водного раствора), гранулировали сквозь сетку из нержавеющей стали с диаметром отверстий 1,5 мм, высушивали при температуре не более 60 °С, вновь протирали сквозь сетку с диаметром отверстий 0,5 мм и добавляли 0,02 г (или 0,018 г, или 0,022 г) лизиноприла дигидрата (точная навеска).

Для определения лизиноприла методом УФ-спектрофотометрии нами использована методика, разработанная ранее [1]: 0,2 г модельной смеси гранул лизиноприла дигидрата помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в небольшом объеме воды, доводили этим же растворителем до метки, перемешивали и фильтровали через фильтр типа «синяя лента» (раствор А). 5 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляли 1 мл 0,5 % водного раствора натрия карбоната, 0,5 мл 2 % спиртового раствора нингидрина. Доводили общий объем раствора до 15 мл водой и нагревали на водяной бане при температуре 80±5 °С в течение 20 минут. Затем испытуемый раствор охлаждали, доводили растворителем до метки и перемешивали. Оптическую плотность полученного раствора измеряли при 565 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали растворитель с теми же реактивами, что и испытуемый раствор.

Содержание количества вещества лизиноприла дигидрата в г (X) в модельной смеси гранул вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot a_{cm} \cdot 100,00 \cdot 25,00 \cdot 5,00 \cdot P}{A_{cm} \cdot a_x \cdot 5,00 \cdot 25,00 \cdot 100,00} = \frac{A_x \cdot a_{cm} \cdot P}{A_{cm} \cdot a_x}$$

где: A_x , A_{cm} – оптическая плотность анализируемого раствора и раствора СО лизиноприла дигидрата, соответственно;

a_x , a_{cm} – навеска анализируемого раствора и СО лизиноприла дигидрата, соответственно, г;

P – средняя масса гранул в одной дозе лекарственной формы, г.

Для определения лизиноприла дигидрата методом ВЭЖХ нами была усовершенствована методика [4], что позволило проводить анализ без использования органических растворителей для приготовления исследуемых и стандартного растворов. В качестве подвижной фазы выбрана система растворителей: ацетонитрил – фосфатный буфер (рН=2,2) в соотношении 75:15, изократический режим элюирования. Методика определения: 5 мл раствора А (смотреть метод УФ-спектрофотометрии) помещали в колбу объемом 100 мл, доводили водой до метки и перемешивали. Полученный раствор хроматографировали со скоростью потока 0,8 мл/мин. Объем вводимой пробы составлял 20 мкл, температура термостата колонки – 40 °С. Детектирование осуществляли в УФ-свете при длине волны 215 нм.

Содержание лизиноприла в г (X) в модельной смеси гранул рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S_x \cdot a_{cm} \cdot 100,00 \cdot 100,00 \cdot 5,00 \cdot P}{S_{cm} \cdot a_x \cdot 5,00 \cdot 100,00 \cdot 100,00} = \frac{S_x \cdot a_{cm} \cdot P}{S_{cm} \cdot a_x}$$

где S_x , S_{cm} – площади пиков анализируемого образца и СО, соответственно, мм²;

a_x , a_{cm} – навеска анализируемого раствора и СО лизиноприла дигидрата, соответственно, г;

P – средняя масса гранул в одной дозе лекарственной формы, г.

Результаты исследования и их обсуждение

Перед статистической обработкой данных была проведена проверка однородности выборок [5] и установлено, что все они не содержат грубой ошибки, т.к. $Q_1 < Q$ ($n=6$, $P=95\%$), т.е. $Q_1 < 0,56$.

Валидацию разработанных методик проводили в соответствии с проектом ОФС 42-0113-09 «Валидация аналитических методик».

Специфичность разработанных методик определяли, изучая влияние вспомогательных веществ на протекание и результаты эксперимента. Для этого в методе УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ были предварительно проведены исследования на модельной смеси вспомогательных веществ. В соответствии с полученными результатами

нами установлено, что присутствие вспомогательных веществ не мешает определению лизиноприла дигидрата в гранулах.

Аналитическая область методики находится в пределах линейной зависимости и составляет для метода УФ-спектрофотометрии 32–48 мкг/мл, для метода ВЭЖХ 8-12 мкг/мл лизиноприла и описывается уравнением $y=128,7x-0,101$ с коэффициентом корреляции $r_1=0,995$ (для УФ-спектрофотометрии) и $y=26371x-94,02$ с $r_2=0,999$ (для ВЭЖХ). В обоих случаях выполняется необходимое условие линейной зависимости $|r| \geq 0,99$.

Правильность предлагаемых методик определяли на 6 образцах модельных смесей гранул с известным содержанием лизиноприла дигидрата (табл. 1).

Таблица 1. Определение правильности спектрофотометрической методики (1) и ВЭЖХ-методики (2) определения лизиноприла дигидрата

| Метод | μ , г | x , г | R , % | Метрологические характеристики |
|-------|-----------|---------|---------|---|
| 1 | 0,02107 | 0,02098 | 99,57 | $\bar{R}=99,15$ $s^2=4,91$ $s=2,217$ $t_{\text{выч}}=0,93$ $t_{\text{табл.}}=2,57$ |
| | 0,02093 | 0,02021 | 96,56 | |
| | 0,02098 | 0,02030 | 96,76 | |
| | 0,01997 | 0,02040 | 102,15 | |
| | 0,01985 | 0,02054 | 98,99 | |
| | 0,01992 | 0,02098 | 100,87 | |
| 2 | 0,02000 | 0,02017 | 100,85 | $\bar{R}=99,79$ $s^2=0,503$ $s=0,709$ $t_{\text{выч}}=0,73$ $t_{\text{табл.}}=2,57$ |
| | 0,02019 | 0,02016 | 99,85 | |
| | 0,02020 | 0,02014 | 99,70 | |
| | 0,02030 | 0,02002 | 98,80 | |
| | 0,02023 | 0,02019 | 98,80 | |
| | 0,02017 | 0,02015 | 99,90 | |

В обеих методиках соблюдается неравенство $t_{\text{выч}} < t_{\text{табл}} (P, f)$, следовательно, представленные результаты не отягощены систематической ошибкой и являются правильными.

С целью проверки повторяемости методик проводили трехуровневый эксперимент по 3 опыта на каждом уровне. Диапазон измерения был выбран исходя из варьирования количества вещества лизиноприла в гранулах ($\pm 20\%$). Таким образом, верхнему уровню соответствует навеска 0,018 г, среднему – 0,020 г, нижнему – 0,022 г. С целью получения метрологических характеристик методик была проведена статистическая обработка результатов количественного определения лизиноприла дигидрата в гранулах методом УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ (табл. 2).

Таблица 2. Результаты определения повторяемости методик определения лизиноприла дигидрата методом УФ-спектрофотометрии (1) и ВЭЖХ (2)

| Метод | Уровень | Лизиноприла дигидрат, г | | R, % | f | \bar{x} | s ² | s | P | $\Delta\bar{x}$ | ε | t _{выч} | F _{табл} (P, f ₁ , f ₂) | F _{выч} |
|-------|---------|-------------------------|---------|--------|---|-----------|----------------|-------|-----|-----------------|------|------------------|--|------------------|
| | | взято | найдено | | | | | | | | | | | |
| 1 | I | 0,01810 | 0,01783 | 98,50 | 8 | 99,19 | 1,570 | 1,253 | 95% | 0,915 | 0,92 | 1,93 | 3,44 | 8,77 |
| | | 0,01807 | 0,01793 | 99,20 | | | | | | | | | | |
| | | 0,01824 | 0,01785 | 97,85 | | | | | | | | | | |
| | II | 0,02107 | 0,02098 | 99,57 | | | | | | | | | | |
| | | 0,02080 | 0,02098 | 100,87 | | | | | | | | | | |
| | | 0,02075 | 0,02054 | 98,99 | | | | | | | | | | |
| | III | 0,02215 | 0,02195 | 99,10 | | | | | | | | | | |
| | | 0,02188 | 0,02127 | 97,20 | | | | | | | | | | |
| | | 0,02210 | 0,02241 | 101,40 | | | | | | | | | | |
| 2 | I | 0,01820 | 0,01807 | 99,30 | 8 | 99,96 | 0,179 | 0,424 | 95% | 0,309 | 0,31 | 0,28 | 3,44 | 8,77 |
| | | 0,01813 | 0,01811 | 99,89 | | | | | | | | | | |
| | | 0,01805 | 0,01797 | 99,53 | | | | | | | | | | |
| | II | 0,02019 | 0,02016 | 99,85 | | | | | | | | | | |
| | | 0,02017 | 0,02015 | 99,90 | | | | | | | | | | |
| | | 0,02000 | 0,02017 | 100,85 | | | | | | | | | | |
| | III | 0,02210 | 0,2216 | 100,28 | | | | | | | | | | |
| | | 0,02210 | 0,02214 | 100,20 | | | | | | | | | | |
| | | 0,02192 | 0,02188 | 99,81 | | | | | | | | | | |

Согласно данным таблицы 2 $t_{\text{выч}}(1,2) < t_{\text{табл}}$, что позволяет считать результаты выборки обеих методик свободными от систематической ошибки.

Сравнение вычисленного значения критерия Фишера ($F_{\text{выч.}}$) с табличным значением ($F_{\text{табл.}}$), найденном при $P=95\%$ [2], удовлетворяет неравенству: $F_{\text{выч.}} > F_{\text{табл.}}$. Соответственно, различие дисперсий s^2_1 и s^2_2 является статистически значимым, и обе методики дают воспроизводимые результаты, но воспроизводимость метода ВЭЖХ в 3 раза выше, чем в методе УФ-спектрофотометрии.

Выводы

При помощи валидационной оценки установлено, что разработанные методики количественного определения лизиноприла дигидрата в гранулах являются правильными, прецизионными, специфичными и линейными в аналитической области. Однако воспроизводимость метода ВЭЖХ превосходит метод УФ-спектрофотометрии.

Список литературы

1. Бабьяк, А. В. Спектрофотометрическое определение лизиноприла дигидрата // Молодые ученые в решении актуальных проблем науки: сб. науч. тр. – Владикавказ, 2012. – С.150-152.
2. Большев, Л. Н. Таблицы математической статистики /Л. Н. Большев, Н. В. Смирнов. – М.: Наука. Главная редакция физико-математической литературы, 1983. – 416 с.
3. Диагностика и лечение артериальной гипертензии. Российские рекомендации (четвертый пересмотр) // Системные гипертензии. – 2010. – № 3 – 34 с.
4. НД 42-8671-07. Лизиноприл.
5. ОФС 42-0111-09. Статистическая обработка результатов химического эксперимента.
6. Reappraisal of European guidelines on hypertension management: a European Society of Hypertension Task Force document / Mancia G. [et al.] // J. Hypertension. – 2009. – Vol. 27. – P. 2121–2158.

Рецензенты:

Лазарян Джон Седракович, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой токсикологической химии Пятигорского филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ, г. Пятигорск.

Кодониди Иван Панайотович, доктор фармацевтических наук, доцент кафедры органической химии Пятигорского филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ, г. Пятигорск.