

УДК 615.074:547.461.4:543.545.2

## ВАЛИДАЦИОННАЯ ОЦЕНКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛИЦИНА И КИСЛОТЫ ЯНТАРНОЙ В ТАБЛЕТКАХ НООТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Крылов Н. Н., Сенченко С. П., Компанцева Е. В.

*Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, Пятигорск, Россия (357532 Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11), n.n.krylov@mail.ru*

Представлены результаты валидационной оценки методики определения глицина и кислоты янтарной при совместном присутствии в препарате «Гинкготропил-форте», экспериментальная серия от 27.11.14, методом капиллярного электрофореза. Валидационную оценку проводили, используя стандартные образцы глицина и кислоты янтарной и модельные смеси по следующим параметрам, как специфичность, линейность, прецизионность (сходимость) и правильность. Установлено что данная методика является специфичной; область линейной зависимости находится при концентрациях глицина в интервале 0,0025–0,2000 % и янтарной кислоты 0,0050–0,0400 %; сходимость методики имеет относительное стандартное отклонение для глицина  $\pm 1,99$  % и кислоты янтарной  $\pm 2,51$  %; открываемость для обоих веществ находится в пределах для глицина 95–105 % и янтарной кислоты 90–107 %. Полученные результаты могут быть использованы для включения в нормативную документацию на разрабатываемый препарат в разделы «Подлинность», «Количественное определение» проекта ФСП «Таблетки “Гинкготропил-форте” сублингвальные».

Ключевые слова: глицин, кислота янтарная, капиллярный электрофорез, валидация, специфичность, линейность, прецизионность, правильность.

## VALIDATION ASSESSMENT TECHNIQUE FOR DETERMINING GLYCINE AND SUCCINIC ACID IN TABLETS NOOTROPIC ACTION BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Krylov N. N., Senchenko S. P., Kompantseva E. V.

*Pyatigorsk medico-pharmaceutical institute – branch to Volgograd State Medical University, Pyatigorsk, Russia (357532 Stavropol region, Pyatigorsk, st. Kalinin 11), n.n.krylov@mail.ru*

The results of the validation methodology for determining the assessment of glycine and succinic acid in the joint presence of the preparation "Ginkgotropil forte", an experimental series of 11.27.14, by capillary electrophoresis. Validation assessment was carried out using standard samples of glycine and succinic acid, and mixtures of the following model parameters such as specificity, linearity, precision and accuracy. It was found that this method is specific; the region is a linear relationship with the concentration of glycine in the range 0.0025–0.2000 % and succinic acid 0.0050–0.0400 %; the convergence of the method is the relative standard deviation for glycine  $\pm 1,99$  % of succinic acid and  $\pm 2,51$  %; open ability for both substances is in the range of 95–105 % of glycine and succinic acid 90–107 %. The results obtained can be used for inclusion in the legal and technical documentation developed the drug in the sections "authenticity", "Quantitative determination of the" FSP project ""Tablets "Ginkgotropil-forte" sublingual".

Keywords: glycine, succinic acid, capillary electrophoresis, validation, specificity, linearity, precision, accuracy.

При разработке нового лекарственного препарата одной из основных задач является его стандартизация. Ранее нами были разработаны: состав препарата «Гинкготропил-форте» [4] и на примере экспериментальной серии таблеток методика совместного определения в нем глицина и кислоты янтарной методом капиллярного электрофореза [2]. Настоящая работа посвящена валидационной оценке разработанной методики.

### Цель работы

Валидационная оценка методики определения глицина и кислоты янтарной в таблетках ноотропного действия методом капиллярного электрофореза.

## Материалы и методы исследования

Для исследования использовали образцы таблеток разрабатываемого препарата ноотропного действия «Гинкготропил-форте» (экспериментальная серия от 27.11.14); субстанции глицина с количественным содержанием 99,5 % (WIRUD®GL10001, производитель WIRUDGmbH, Германия), кислоты янтарной с содержанием 99,7 % (Huanlong Food Additives Corporation, Китай), а также сухие экстракты гинкго двулопастного и лабазника вязолистного [2].

Работа проводилась с использованием системы капиллярного электрофореза Капель 105 (группа компаний Люмэкс, Россия). Рабочие параметры прибора: кварцевый капилляр диаметром 75 мкм, общей длиной 60 см и эффективной длиной 50 см; детектирование осуществляли спектрофотометрически при длине волны равной 200 нм в катодной области капилляра; напряжение +20 кВ, температура опыта 30 °С; ввод пробы гидродинамически 150 мБар×с; давление, прикладываемое при анализе 10 мБар. Ведущий электролит 0,01 М боратный буферный раствор с рН 9. Для подготовки капилляра и восстановления его поверхности проводили его последовательную промывку водой, 0,5 М раствором кислоты хлористоводородной, водой, 0,5 М раствором натрия гидроксида, водой и затем ведущим электролитом [1–3].

*Методика:* около 0,2 г (точная навеска) массы растертых таблеток (модельной смеси) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в небольшом количестве воды очищенной в течение 10 минут, доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают. 1 мл полученного раствора центрифугируют в течение 5 минут при 8000 мин<sup>-1</sup> и подвергают анализу, прикладывая по ходу эксперимента давление 10 мБар. В аналогичных условиях выполняют анализ растворов стандартных образцов (СО) глицина и кислоты янтарной. Расчет содержания глицина и кислоты янтарной проводили по формуле:

$$X_{г/табл} = \frac{S_x \times a_{ст} \times P}{S_{ст} \times a_x},$$

где:  $S_x$  – площадь исследуемого вещества;

$S_{ст}$  – площадь стандартного образца;

$a_{ст}$  – навеска стандартного образца, г;

$a_x$  – навеска испытуемого образца, г;

$P$  – средняя масса таблеток, г.

### **Приготовление растворов стандартных образцов и модельных смесей таблеток**

Точные навески глицина (0,1000 г) и кислоты янтарной (0,0200 г) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли 50–60 мл воды и довели используемым растворителем до метки.

Для построения градуировочного графика использовали растворы СО следующих концентраций: глицин – 0,0250 %; 0,0500 %; 0,1000 %; 0,1500 %; 0,2000 %; кислота янтарная – 0,0050 %; 0,0100 %; 0,0200 %; 0,0300 %; 0,0400 %.

Модельные смеси таблеток готовили согласно данным, приведенным в таблице 1.

**Таблица 1**

Состав модельных смесей таблеток

Модельная смесь	Содержание анализируемых веществ		Содержание других компонентов в модельных смесях
	Глицин, г	Янтарная кислота, г	
1	Нет	Нет	Экстракт гинкго двулопастного сухого, экстракт лабазника вязолистного сухого и вспомогательных веществ до массы 0,2100 г
2	0,0800	0,0400	
3	0,1000	0,0200	
4	0,1200	0,0100	

### Результаты исследований и их обсуждение

Валидационную оценку разработанной методики устанавливали по показателям: специфичность, линейность, прецизионность и правильность.

Специфичность методики определяли, сравнивая раствор СО глицина и кислоты янтарной с раствором модельной смеси 1 (табл. 1) и раствором экспериментальной серии таблеток. Было установлено, что время миграции глицина и кислоты янтарной в экспериментальной серии таблеток соответствует времени СО данных веществ. Присутствующие в экстрактах гинкго и лабазника биологически активные вещества и вспомогательные вещества таблеток не мешают определению глицина и кислоты янтарной (рис. 1, Б). Полученные данные говорят о специфичности методики.

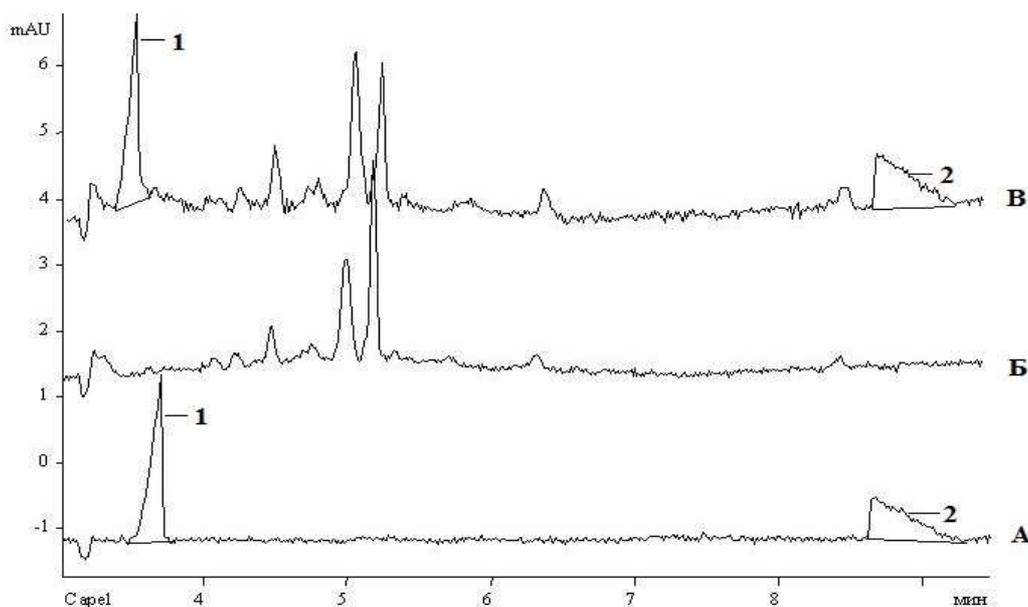


Рис.1. Электрофореграммы растворов: А – раствор СО глицина (1) и кислоты янтарной (2); Б – раствор модельной смеси 1; В – раствор экспериментальной серии таблеток

Линейность методики определяли по результатам анализа серии растворов СО глицина в интервале концентраций 0,0025–0,2000 % и янтарной кислоты 0,0050–0,0400 %. На рисунках 2 и 3 представлены графики зависимости площади пика исследуемых веществ от их концентраций в пробе. Полученная зависимость имеет линейный характер и описывается уравнениями регрессии:  $y = 259,23x + 0,9116$  (глицин) и  $y = 1264,3x - 0,0842$  (янтарная кислота). Критерием приемлемости линейности является коэффициент корреляции ( $r \geq 0,99$ ), который составил для глицина и кислоты янтарной 0,9991 и 0,9990 соответственно [5].

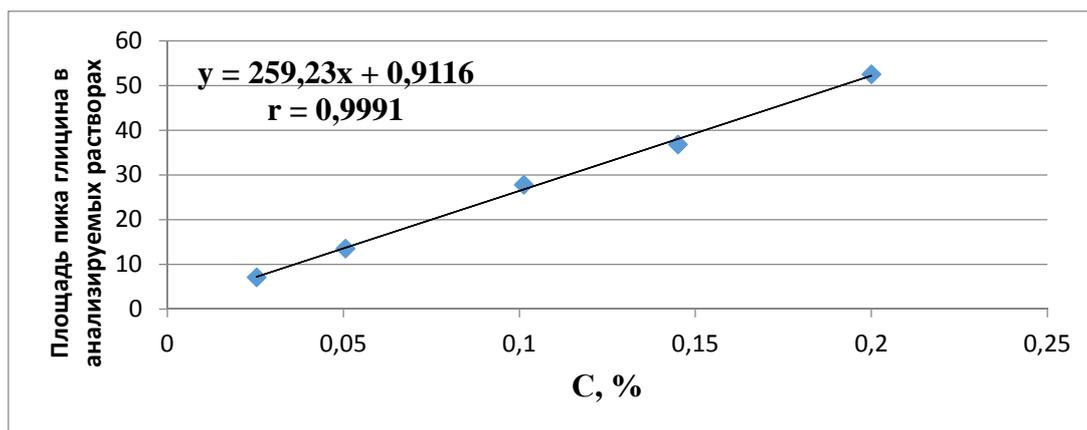


Рис.2. График зависимости площади пика от концентрации глицина в пробе

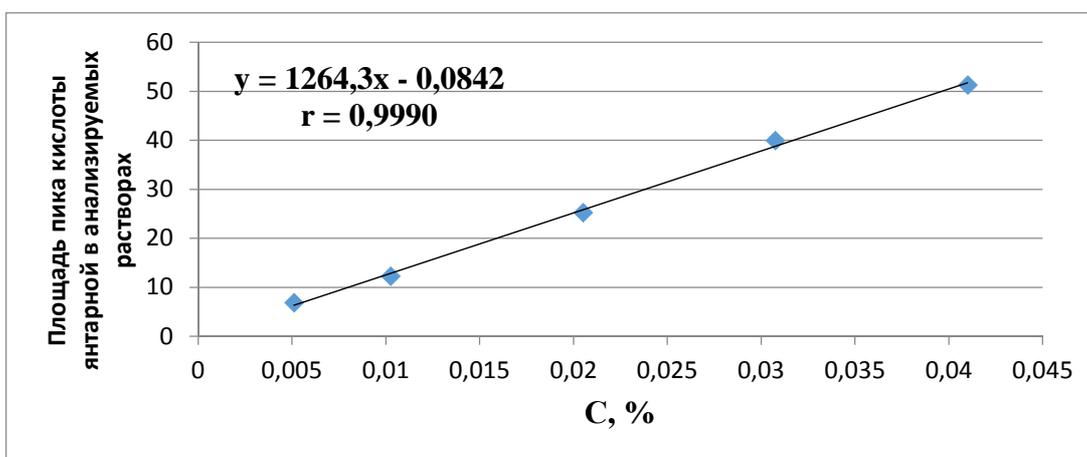


Рис.3. График зависимости площади пика от концентрации янтарной кислоты в пробе

Таким образом, методика валидна по критерию линейность и может быть использована для количественного определения глицина и янтарной кислоты в препарате «Гинкготропил-форте» в указанном диапазоне концентраций.

Для установления прецизионности (сходимости) методики количественного определения глицина и кислоты янтарной, проводили 6 параллельных определений этих компонентов в таблетках «Гинкготропил-форте» экспериментальной серии от 27.11.14. Расчет содержания (г/табл.) проводили с использованием СО. Полученные результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2

Результаты оценки прецизионности методики количественного определения глицина и янтарной кислоты

Взято Масса таблеток, г	Найдено					
	Глицин			Кислота янтарная		
	Площади пиков	X, г/табл.	Метрологические характеристики	Площади пиков	X, г/табл.	Метрологические характеристики
0,2131	22,97	0,0970	$\bar{X} = 0,0987$ $SD = 0,002$ $RSD = \pm 1,99\%$	25,06	0,0195	$\bar{X} = 0,0201$ $SD = 0,001$ $RSD = \pm 2,51\%$
0,2096	22,67	0,1020		24,98	0,0198	
0,2109	22,88	0,1000		26,34	0,0201	
0,2137	22,83	0,0970		26,28	0,0200	
0,2082	22,15	0,0980		25,95	0,0210	
0,2090	22,19	0,0980		26,39	0,0200	

Критерий приемлемости, выражаемый через величину относительного стандартного отклонения (RSD,%), составляющий  $\pm 1,99\%$  (глицин) и  $\pm 2,51\%$  (кислота янтарная), удовлетворяет требованиям по параметру сходимости, что свидетельствует о валидности данной методики по показателю прецизионность [5].

Правильность методики определяли путем анализа 9 образцов модельных смесей на трех уровнях концентраций. Оценка правильности проводили по параметру «открываемость» (R, %). Полученные результаты представлены в таблицах 3,4.

Таблица 3

Результаты оценки правильности методики количественного определения глицина в модельной смеси таблеток

Глицин					
Уровень	Навеска*, г	Содержание в модельной смеси, г	Найдено, г	R, %	Метрологические характеристики
1	0,2013	0,0800	0,0805	100,63	$\bar{X} = 99,91\%$ $SD = 1,33\%$ $RSD = \pm 1,34\%$
1	0,2062	0,0800	0,0791	98,88	
1	0,2030	0,0800	0,0802	100,25	
2	0,2036	0,1000	0,0975	97,50	
2	0,2101	0,1000	0,0991	99,10	
2	0,2056	0,1000	0,1017	101,70	
3	0,2068	0,1200	0,1192	99,33	
3	0,2109	0,1200	0,1217	101,42	
3	0,2090	0,1200	0,1205	100,42	

Таблица 4

Результаты оценки правильности методики количественного определения кислоты янтарной в модельной смеси таблеток

Кислота янтарная					
Уровень	Навеска*, г	Содержание в модельной смеси, г	Найдено, г	R, %	Метрологические характеристики
1	0,2013	0,0100	0,0098	98,00	
1	0,2062	0,0100	0,0102	102,00	
1	0,2030	0,0100	0,0099	99,00	

2	0,2036	0,0200	0,0198	99,00	$\bar{X} = 99,69 \%$ $SD = 2,88 \%$ $RSD = \pm 2,89 \%$
2	0,2101	0,0200	0,0192	96,00	
2	0,2056	0,0200	0,0210	105,00	
3	0,2068	0,0400	0,0394	98,50	
3	0,2109	0,0400	0,0389	97,25	
3	0,2090	0,0400	0,0410	102,50	

*\*Навески: 1–3 – модельная смесь 2; 4–6 – модельная смесь 3; 7–9 – модельная смесь 4 (см. табл.2)*

Полученные результаты свидетельствуют, что значения открываемости для обоих веществ находятся в пределах для глицина 95–105 % и янтарной кислоты 90–107 %, что согласно общепринятым рекомендациям свидетельствует о валидности методики по данному показателю [5].

### **Выводы**

Методика определения глицина и кислоты янтарной методом капиллярного электрофореза валидна по показателям: специфичность, линейность, прецизионность, правильность и может быть использована для включения в нормативно-техническую документацию на разрабатываемый препарат в разделы «Подлинность», «Количественное определение» проекта ФСП «Таблетки “Гинкготропил-форте” сублингвальные».

### **Список литературы**

1. Комарова Н.В. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель» / Н.В. Комарова, Я.С. Каменцев. – СПб.: ООО «Веда», 2006. – 212 с.
2. Крылов Н.Н. Разработка методики определения глицина и кислоты янтарной в таблетках ноотропного действия методом капиллярного электрофореза // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 4; URL: <http://www.science-education.ru/127-20954> (дата обращения: 30.07.2015).
3. Межгосударственный стандарт ГОСТ 4919.2-77. «Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления буферных растворов».
4. Технологические аспекты разработки сублингвальных таблеток «Гинкготропил-форте» /А.М. Шевченко, Н.Н. Крылов, Е.В. Компанцева и др.// Фармацевтический кластер как интеграция науки, образования и производства: сб. материалов 5-й Междунар. науч.-практ. телеконф. 17 апреля 2015 г. – Белгород, 2015. – С. 210-216.
5. Guidelines for standard method performance requirements [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [http://www.eoma.aoac.org/app\\_f.pdf](http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf) (дата обращения: 08.09.2015).

### **Рецензенты:**

Лазарян Д.С., д.фарм.н., профессор, зав. кафедрой фармацевтической и токсикологической химии ПМФИ – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск;

Кодониди И.П., д.фарм.н., доцент кафедры органической химии ПМФИ – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск.