

УДК 615.014

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ И ВЭЖХ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ДОСТУПНОСТИ И КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ КИСЛОТЫ ЯНТАРНОЙ И НИКОТИНОВОЙ В СУППОЗИТОРИЯХ

¹Симонян Е.В., ²Хачатрян М.А.¹ГБОУ ВПО «Южно – Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, e-mail: kanc@chelsma.ru;²Ереванский государственный университет Республика Армения, Ереван, e-mail: info@ysu.am

Разработаны методики количественной оценки кислоты янтарной и никотиновой спектрофотометрическим методом с использованием внешнего стандарта. В качестве реагента предложен раствор калия дихромата. Изучен характер спектров поглощения и подобран оптимальный диапазон pH, позволяющий с большей достоверностью проводить количественное определение производных карбоновых кислот. Данный метод предложен для исследования процесса высвобождения лекарственных средств из суппозитория с целью проведения биофармацевтического анализа. Проведена валидация предложенной методики по показателям: линейность, воспроизводимость, прецизионность, сходимость. Для количественного определения кислоты никотиновой и янтарной в суппозиториях предложен вариант обращения – фазовой ВЭЖХ. Подобраны оптимальные условия (состав подвижной фазы, скорость подачи элюента, длина волны детектирования). На основании полученных данных проведена валидационная оценка предлагаемых методов.

Ключевые слова: кислота янтарная, кислота никотиновая, калия дихромат, спектрофотометрия, ВЭЖХ

USING SPECTROPHOTOMETRY AND HPLC FOR DETERMINATION OF PHARMACEUTICAL AVAILABILITY AND THE QUANTIFICATION OF SUCCINIC ACID AND NICOTINIC RECTAL SUPPOSITORIES

¹Simonyan E.V., ²Khachatryan M.A.¹South – Ural State Medical University, Chelyabinsk, e-mail: kanc@chelsma.ru;²Yerevan state University, Yerevan, e-mail: info@ysu.am

Quantifying the methods succinic acid and nicotinic spectrophotometrically using an external standard. The reagent proposed solution of potassium dichromate. The character of the absorption spectra and choose the optimal pH range, allowing more certainty to carry out quantitative determination of carboxylic acid derivatives. This method is proposed to study drug release process means of suppositories with the purpose of biopharmaceutical analysis. Spend validation of the proposed method in terms of: linearity, repeatability, precision, convergence. For the quantitative determination of nicotinic acid and succinic suppositories proposed variant reversed – phase HPLC. optimal conditions (mobile phase, flow rate of the eluent, detection wavelength). Based on these data held validation assessment of the proposed methods.

Keywords: succinic acid, nicotinic acid, potassium dichromate, spectrophotometry, HPLC

На эффективность и качественные характеристики лекарственной формы влияют не только природа вспомогательных веществ, но и их количество и соотношения между собой [1, 4, 7]. Они оказывают существенное влияние на процесс высвобождения лекарственных средств, в связи с чем, проведение биофармацевтических исследований является актуальным при разработке технологии новых лекарственных форм. Целью настоящего исследования было изучение возможности использования спектральных и хроматографических методов для контроля процесса высвобождения и количественное определение кислоты янтарной и никотиновой из суппозитория [3].

Материалы и методы исследования

На основании проведенных исследований установлено, что оптимальными биофармацевтическими

свойствами обладают композиции состава: кислоты никотиновой – 0,5; ПЭГ 4000 – 1,0 кремофор RH – 40 – 12,5; лутол F- 68 – 7,5; эмульгатор T- 2 – 0,1 и ПЭГ 400 – 0,5; ПЭГ 1500 – 0,5; ПЭГ 4000 – 0,5; кремофор RH 1,0; твин 80 – 0,1; вода очищенная 0,5 мл; кислота янтарная 0,1 [6].

Предварительные исследования показали, что спектры поглощения кислоты янтарной, ввиду отсутствия хромофорных групп не отличаются четко выраженным максимумом светопоглощения, что не всегда подходит для экспресс – анализа лекарственных средств, особенно при изучении процесса высвобождения в биофармацевтических исследованиях. Изучение спектральных характеристик кислоты никотиновой показало, что характер спектра меняется в зависимости от величины pH. Так, спектр поглощения препарата в кислой среде характеризуется неустойчивым максимумом светопоглощения при 260 – 270 нм, в зависимости от концентрации кислоты никотиновой, а растворы препарата в 0,1 моль/л растворе натрия гидроксида – имеют три максимума светопоглощения в области 260 – 270 нм. При этом

характер спектра может меняться в зависимости от концентрации лекарственного средства. Поэтому необходимо было разработать оптимальные методики спектрофотометрического определения исследуемых кислот в лекарственных формах.

В аналитической практике для спектрофотометрического определения веществ часто применяют внешние образцы сравнения, в качестве которых используются соединения органической и неорганической природы, отвечающие требованиям, предъявляемым к образцам сравнения. При выборе внешнего стандарта следует учитывать тот факт, что оптимальным является тот образец, для которого расстояние между положением его максимума и аналитической длиной волны определяемого вещества не превышает половины полуширины полосы поглощения внешнего стандарта [5]. В качестве образца нами был выбран калия дихромат. Известно, что его спектр поглощения при pH 1,1 – 3,0 характеризуется двумя максимумами при 257 ± 2 и 350 ± 2 нм. Аналитическими областями поглощения и величины полуширины (Δ), соответственно, составляют $247 - 267$ ($\Delta - 20$ нм) и $340,5 - 359,5$ ($\Delta - 20$ нм). Известно, что рКа кислоты никотиновой равен 4,73, поэтому оптимальная область pH раствора никотиновой кислоты находится в 7,73. При этом известно, что наиболее стабильна форма кислоты никотиновой в виде аммонийной соли. Однако, высвобождение кислоты никотиновой в ходе диализа более целесообразно проводить в фосфатный буферный раствор со слабощелочным значением pH. Поэтому мы использовали в качестве растворителя фосфатный буферный раствор с pH 7,8. В данном растворителе спектр поглощения калия дихромата характеризуется максимумами при 335 и 375 ± 2 нм.

Результаты исследования и их обсуждение

Исследование характера взаимодействия раствора препарата и извлечения из суппозиторной массы, содержащей кислоту никотиновую, в присутствии с раствором калия дихромата показал, что спектра поглощения обоих растворов характеризуется двумя максимумами светопоглощения при 270 ± 2 и 300 ± 2 нм. Кислота янтарная собой двухосновную карбоновую кислоту,

у которой ориентация карбокси – групп может приводить к образованию различных структур и сдвигу полосы поглощения. Установлено, что спектр поглощения раствора кислоты в присутствии калия дихромата характеризуется максимумами светопоглощения при 285 ± 2 , 340 ± 2 и 375 ± 2 нм. При этом максимумы в области 340 и 375 нм соответствовали светопоглощению калия дихромата. Для определения линейности методики готовили растворы РСО кислоты никотиновой, янтарной и фумаровой в концентрации 0,002 – 0,02 %. Результаты приведены на рис. 4.

Установлено, что в данном диапазоне и кислота янтарная, и никотиновая имеют линейное светопоглощение. Коэффициент корреляции приближается к 1,0. Оптимальная величина оптической плотности наблюдается в интервале концентраций 0,008 – 0,014 %. Для валидации методики готовили модельные смеси [2]. Результаты количественного определения кислоты никотиновой и янтарной представлены в табл. 1.

Для определения правильности методики применяли модельные смеси РСО кислоты никотиновой и янтарной в трех концентрациях в процентах относительно первоначального значения 70, 100, 130 %. Измерения проводили в трех повторностях для каждого значения концентрации, в соответствии с табл. 2 и 3.

Полученный средний процент восстановления в трех проводимых концентрациях в трех повторностях составил 98,98 % и 97,48 % для кислоты никотиновой и янтарной, соответственно, что укладывается в допустимые пределы приемлемости 100 ± 5 %. Для установления достоверности методики использовали вариант «введено-найденно» на пяти значениях концентраций (табл. 4 и 5).

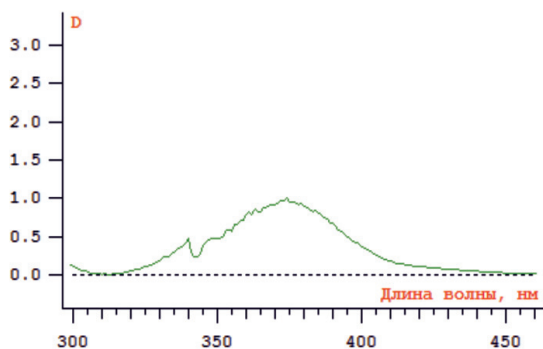


Рис. 1. УФ – спектр раствора калия дихромата в фосфатном буферном растворе

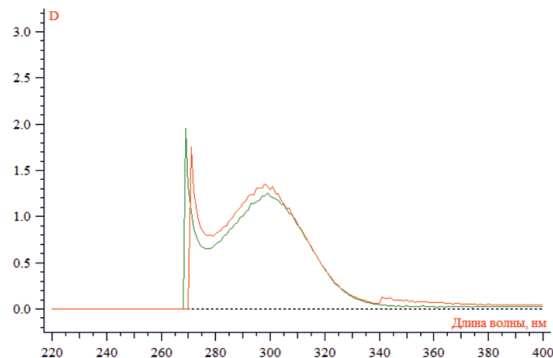


Рис. 2. УФ – спектр поглощения кислоты никотиновой и извлечения из суппозиторной массы с раствором калия дихромата

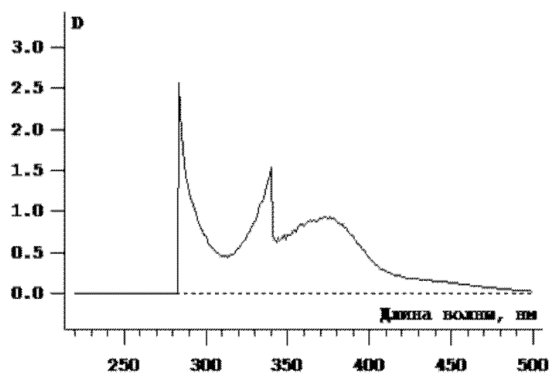


Рис. 3. УФ-спектр поглощения кислоты янтарной с раствором калия дихромата

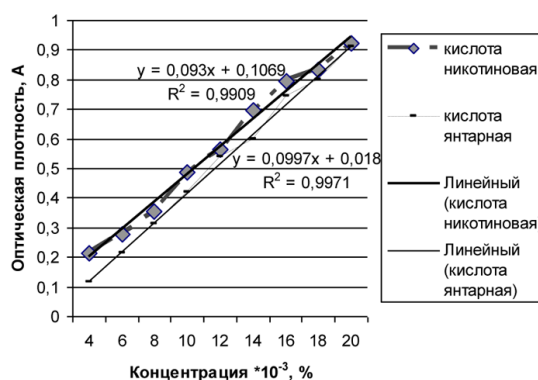


Рис. 4. График линейной зависимости кислоты янтарной и никотиновой

Таблица 1

Результаты количественного определения кислоты никотиновой и янтарной в модельных смесях спектрофотометрическим методом

№ образца	Найдено кислоты никотиновой, г	Валидационная оценка	Найдено кислоты янтарной, г	Валидационная оценка
1	0,4985	SD = 5,72*10 ⁻²	0,0928	SD = 1,087*10 ⁻³
2	0,4973	RSD = 2,34*10 ⁻²	0,0937	RSD = 0,443*10 ⁻³
3	0,4898	ΔX = 6,01*10 ⁻²	0,0917	ΔX = 1,14*10 ⁻³
4	0,4963	ε = 1,219 %	0,0929	ε = 1,24 %
5	0,4887		0,0920	
6	0,4894		0,0906	
	X _{ср} = 0,4932		X _{ср} = 0,0923	

Таблица 2

Результаты количественного анализа модельных смесей суппозиторий с различным содержанием кислоты никотиновой

Проба	Значение измеряемой величины в модельной смеси, г	Значение, найденное экспериментально	
		Абсолютная величина, г	Процент восстановления, %
1.1	0,3500	0,3493	99,80
1.2	0,3500	0,3485	99,57
1.3	0,3500	0,3491	99,74
2.1	0,5000	0,4892	97,84
2.2	0,5000	0,4923	98,46
2.3	0,5000	0,4886	97,72
3.1	0,6500	0,6452	99,26
3.2	0,6500	0,6471	99,55
3.3	0,6500	0,6429	98,91
Средний процент восстановления, %			98,98

Кроме того, были определены прецизионность и сходимость методики проводили на спектрофотометре СФ 56 в разные дни одним и тем же специалистом на одной пробе в шести повторностях. Относительное стандартное отклонение не превысило

15%. Критерий Стьюдента экспериментальный меньше табличного (2,57) в обоих случаях. Воспроизводимость методики определяли в двух лабораториях на приборах СФ-56 и СФ – 101 в шести повторностях. На основании полученных данных

было установлено, что данная методика может быть применена для количественной оценки высвобождения производных карбоновых кислот из лекарственных форм.

При разработке методики количественного определения использовали обращено – фазовый вариант ВЭЖХ. Были подобраны условия хроматографирования для кислоты никотиновой и установлено, что оптимальный состав подвижной фазы – ацетонитрил – воды (70:30), длина волны детектирования составила 260 нм. В дан-

ных условиях получен достаточно четкий пик кислоты никотиновой с временем удерживания 1,5 минут (рис. 5). Для выбора оптимальных условий изучили влияние pH на хроматографический процесс. Результаты представлены в табл. 6.

Установлено, что с увеличением значения pH увеличивается коэффициент асимметрии на фоне снижения эффективности разделения. При этом величина pH не оказывает существенного воздействия на время удерживания и коэффициент емкости.

Таблица 3

Результаты количественного анализа модельных смесей суппозитория с различным содержанием кислоты янтарной

Проба	Значение измеряемой величины в модельной смеси, г	Значение, найденное экспериментально	
		Абсолютная величина, г	Процент восстановления, %
1.1	0,0700	0,0683	97,57
1.2	0,0700	0,0691	98,71
1.3	0,0700	0,0679	97,00
2.1	0,1000	0,0984	98,40
2.2	0,1000	0,0961	96,10
2.3	0,1000	0,0955	95,50
3.1	0,1300	0,1261	97,00
3.2	0,1300	0,1284	98,80
3.3	0,1300	0,1277	98,23
Средний процент восстановления, %			97,48

Таблица 4

Результаты количественного определения кислоты никотиновой в модельных смесях методом добавок

Содержание кислоты никотиновой в модельной смеси, г	Добавлено кислоты никотиновой, г	Содержание кислоты никотиновой, г		Ошибка	
		Расчетная, г	Найденная, г	Абсолютная, %	Относительная, %
0,4976	0,0500	0,5476	0,5453	– 0,0023	0,42 %
0,4976	0,1000	0,5976	0,5923	– 0,0053	0,89 %
0,4976	0,1500	0,6476	0,6434	– 0,0042	0,65 %
0,4976	0,2000	0,6976	0,6905	– 0,0071	1,02 %
0,4976	0,2500	0,7476	0,7451	– 0,0025	0,34 %

Таблица 5

Результаты количественного определения кислоты янтарной в модельных смесях методом добавок

Содержание кислоты янтарной в модельной смеси, г	Добавлено кислоты янтарной, г	Содержание кислоты янтарной, г		Ошибка	
		Расчетная, г	Найденная, г	Абсолютная, %	Относительная, %
0,0926	0,0100	0,1026	0,1008	– 0,0018	1,94 %
0,0926	0,0200	0,1126	0,1103	– 0,0023	2,48 %
0,0926	0,0300	0,1226	0,1215	– 0,0011	1,19 %
0,0926	0,0400	0,1326	0,1313	– 0,0013	1,40 %
0,0926	0,0500	0,1426	0,1407	– 0,0019	2,05 %

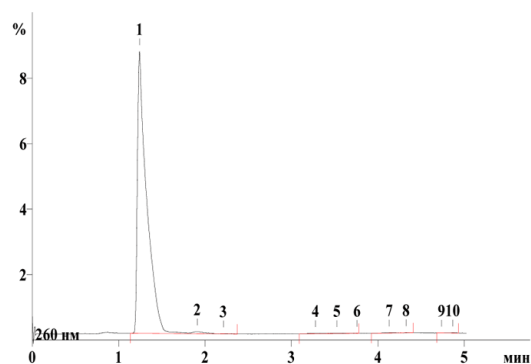


Рис. 5. Хроматограмма кислоты никотиновой при 260 нм

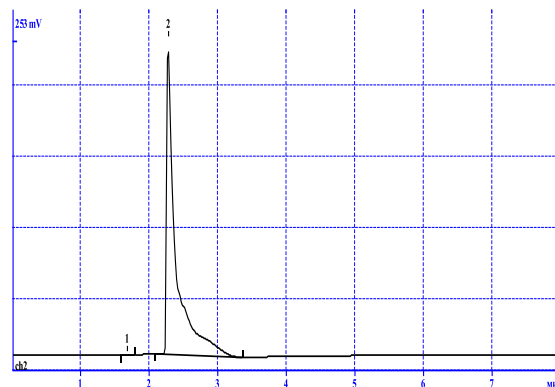


Рис. 6. Хроматограмма кислоты янтарной при 210 нм

Таблица 6

Параметры хроматографической системы для определения кислоты никотиновой в зависимости от величины pH

pH	Время удерживания, сек. t_R	Коэффициент емкости, k'	Эффективность, N	Фактор асимметрии, As
4,0	108	2,6	74649	1,47
5,0	105	2,4	74267	1,87
6,0	107	2,6	73281	1,88
8,0	108	2,6	73974	1,87
9,0	114	2,5	72876	1,94
10,0	114	2,6	72761	1,92

Таблица 7

Результаты количественного определения кислоты янтарной и никотиновой методом ВЭЖХ

Показатель	Кислота янтарная	Кислота никотиновая
Линейность	$y = 16,057x + 15,467; R^2 = 0,9931$	$y = 24,6x + 23,4; R^2 = 0,9988$
Прецизионность	$RSD = 2,94 \cdot 10^{-4}$	$RSD = 0,65 \cdot 10^{-4}$
Правильность	$R = 100,13 \%$	$R = 97,85$
Содержание, г (х ср $\pm$ SD)	$0,09821 \pm 0,00072$	$0,4892 \pm 0,00016$

Для анализа кислоты янтарной нами также были изучены условия хроматографического определения. Установлено, что коэффициент гидрофобности составляет – 1,65, что свидетельствует о гидрофильности молекулы. Поэтому за основу брали методику, предложенную для количественного определения карбоновых кислот в различных напитках. В качестве элюента использовали кислоту серную в концентрации 0,005 – 0,2 моль/л. Скорость подачи элюента варьировала от 50 до 200 мкл/мин. В качестве длины волны детектирования использовали 210 нм, поскольку в данной области кислота янтарная обладают некото-

рым светопоглощением. Установлено, что время удерживания кислоты янтарной составляет 2,5 минуты (рис. 6).

Данные методики были апробированы и валидированы для разработанных лекарственных форм. Результаты представлены в табл. 7.

Выводы

1. Предложено использование калия дихромата в качестве внешнего стандарта при проведении биофармацевтических исследований для контроля высвобождения кислоты никотиновой и янтарной из суппозитория.

2. Изучены хроматографические параметры и предложен метод ВЭЖХ для количественной оценки кислоты янтарной и никотиновой в суппозиториях.

Список литературы

1. Астраханова М.М. Суппозитории как лекарственная форма высокой биологической доступности / М.М. Астраханова, В.Ф. Охотникова // *Вопр. биол., мед. и фармац. химии.* – 2010. – № 6. – С. 9–12.
2. Арзамасцев А.П. Валидация аналитических методов / А.П. Арзамасцев, Н.П. Садчикова, Ю.Я. Харитонов // *Фармация.* – 2006. – № 4. – С. 8–12.
3. Биофармацевтические исследования суппозитория, содержащих кислоту никотиновую и экстракт прополиса / Шикова Ю.В., Лиходед В.А., Симонян Е.В., Епифанова А.В., Бахтиярова С.Б., Зарипов Р.А. – *Фармация*, № 3, 2015, С. 26–29.

4. Вспомогательные вещества, применяемые в технологии суппозитория / Н.С. Михеева, В.Ф. Охотникова М.А. Джавахян [и др.] // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* – 2013. – № 9. – С. 16–19.

5. Илларионова Е.А. Внешние образцы сравнения лекарственных средств в спектрофотометрическом анализе / Е.А. Илларионова, И.П. Сыроватский, Е.М. Артасюк // *Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: (матер. 58-й межрег. конф.).* – Пятигорск, 2003. – С. 206–208.

6. Ректальные суппозитории с никотиновой кислотой и экстрактом прополиса (патент). № 2537242; заявл. 07.05.13; опубл. 27.12.14, Бюл. 36.

7. Шикова Ю.В. Роль современных вспомогательных веществ в производстве мягких лекарственных форм / Ю.В. Шикова, В.А. Лиходед, А.В. Епифанова и др. // *Сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции «Образование и наука: современное состояние и перспективы развития».* – Тамбов, 2013. – С. 150–151.