

УДК 615.276'454.23.014.22.07

ВАЛИДАЦИОННАЯ ОЦЕНКА МЕТОДИК АНАЛИЗА СУППОЗИТОРИЕВ С ДИКЛОФЕНАКОМ НАТРИЯ И КИСЛОТОЙ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ**Степанова Э.Ф., Саенко А.Ю., Петров А.Ю., Куль И.Я.***Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, Пятигорск, e-mail: E.F.Stepanova@mail.ru*

Проведена валидационная оценка разработанных суппозитриев, содержащих диклофенак натрия и кислоте ацетилсалициловую. Валидационную оценку проводили по показателям: специфичность, линейность, прецизионность, правильность. Для идентификации компонентов использован метод хроматографии в тонком слое сорбента. Подтверждена специфичность качественного обнаружения диклофенака натрия и кислоты ацетилсалициловой методом ТСХ. Количественное определение компонентов проводили спектрофотометрическим методом Фирордта. Анализ проводили в максимумах поглощения диклофенака натрия и кислоты ацетилсалициловой. Для доказательства линейности строили градуировочный график и рассчитывали уравнение градуировочного графика. Рассчитанный коэффициент корреляции подтвердил линейность методики анализа. Оценка прецизионности методик выполняли, используя величину относительного стандартного отклонения. Правильность подтверждали, оценивая показатель «открываемость». Полученные результаты подтверждают валидность разработанных методик и возможность их использования для оценки качества предлагаемых суппозитриев.

Ключевые слова: суппозитории, диклофенак натрия, кислота ацетилсалициловая, валидация**VALIDATION ESTIMATION OF THE METHODS OF ANALYSIS OF SUPPOSITORIES CONTAINING DICLOFENAC SODIUM AND ACETYLSALICYLIC ACID****Stepanova E.F., Saenko A.Y., Petrov A.Y., Kul I.Y.***Pyatigorsk Medical-Pharmaceutical Institute – branch of SBEE HPE Volg SMU of Minzdrav of Pyatigorsk, Pyatigorsk, e-mail: E.F.Stepanova@mail.ru*

There was carried out the validation estimation of the developed suppositories containing diclofenac sodium and acetylsalicylic acid. Validation estimation was carried out according to the following indices: specificity, linearity, precision, accuracy. The method of chromatography in the thin layer of sorbent was used for the identification of components. There was proved the specificity of qualitative determination of diclofenac sodium and acetylsalicylic acid by the method of thin-layer chromatography. The quantitative determination of components was carried out by the spectrophotometric method of Firordth. The analysis was carried out in maxima absorption of diclofenac sodium and acetylsalicylic acid. For the proof of linearity we graphed the calibrating diagram and calculated the calibrating diagram equation. The calculated correlation coefficient confirmed the linearity of the analysis methods. Precision estimation of the methods was carried out using the relative standard deviation value. Accuracy was confirmed by estimating the index of "openability". The obtained results confirm the validity of developed methods and possibility of their use for the quality assessment of the proposed suppositories.

Keywords: suppositories, diclofenac sodium, acetylsalicylic acid, validity

Для подтверждения пригодности методик анализа новых лекарственных средств принято использовать метод валидации. Ранее нами описана технология и анализ разработанных нами ректальных суппозитриев, содержащих диклофенак натрия (ДН) и кислоту ацетилсалициловую (КАС) по 0,05 г [5].

Целью исследования явилось подтверждение точности и достоверности разработанных методик анализа суппозитриев с помощью метода валидации. Для этой цели использованы критерии: специфичность, линейность, прецизионность, правильность.

Материалы и методы исследования

Качественный анализ ингредиентов суппозитриев проводили на пластинках «Сорбфил» в оптимальной системе хлороформ-ацетон-ледяная уксусная кислота (10:10:0,2) [4]. Диклофенак натрия обнаруживали в УФ-свете по появлению фиолетового

пятна на зеленом фоне. Затем хроматограмму обрабатывали раствором железа (III) хлорида и нагревали в течение 5 минут в сушильном шкафу при температуре 105°C. Кислоты ацетилсалициловая и салициловая проявлялись в виде синих пятен на желтом фоне.

Нами были изучены спектры поглощения 0,002 % растворов лекарственных веществ в 0,1 М растворе натрия гидроксида (рис. 1).

Из рис. 1 следует, что спектры ДН и КАС накладываются друг на друга. В этом случае возможно проводить количественный анализ в максимумах поглощения каждого ингредиента, используя метод Фирордта, который дает возможность рассчитать содержание каждого компонента в лекарственном средстве. Причем анализ будет тем точнее, чем больше разность удельных показателей поглощения для выбранной длины волны.

Для подтверждения линейности спектрофотометрического определения ДН и КАС были построены градуировочные графики, рассчитаны уравнения градуировочных графиков и коэффициенты корреляции.

Проверку значимости коэффициента a проводили путем построения 6 графиков для каждого лекарственного вещества, рассчитывая каждый раз

уравнение градуировочного графика. Значения шести коэффициентов а статистически обрабатывали и рассчитывали стандартное отклонение, величину t-критерия и сравнивали с табличным значением.

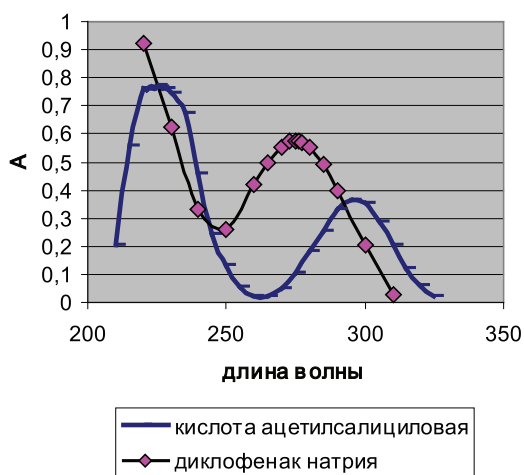


Рис. 1. Спектры поглощения: 0,002% растворов кислоты ацетилсалициловой и диклофенака натрия в 0,1 М растворе натрия гидроксида

Прецизионность (воспроизводимость) согласно материалам ICH – это характеристика случайного

рассеяния. Для этой цели вычисляли величину стандартного отклонения (SD) и относительного стандартного отклонения (RSD). ICH рекомендует оценивать прецизионность по результатам определения не менее 9 аликвот образца (3 концентрации в 3 повторностях), которые позволят статистически рассчитать эти параметры [1].

Проверку внутрилабораторной воспроизводимости проводили два разных аналитика, выполняя анализ каждого ингредиента в одной лаборатории. Оценку воспроизводимости осуществляли путем расчета стандартного (SD) и относительного стандартного отклонения (RSD) [2].

Для тестирования методики на правильность готовили модельные смеси с точным содержанием каждого из компонентов. Согласно рекомендациям ICH, необходимо проанализировать не менее 9 образцов на 3 уровнях концентраций, рассчитывая открываемость вещества [3].

Определения правильности методики спектрофотометрического определения проводили методом добавок.

Результаты исследования и их обсуждение

Система растворителей хлороформ-ацетон-ледяная уксусная кислота (10:10:0,2) позволяет четко разделить и идентифицировать указанные компоненты и кислоту салициловую – продукт деструкции КАС (рис. 2).

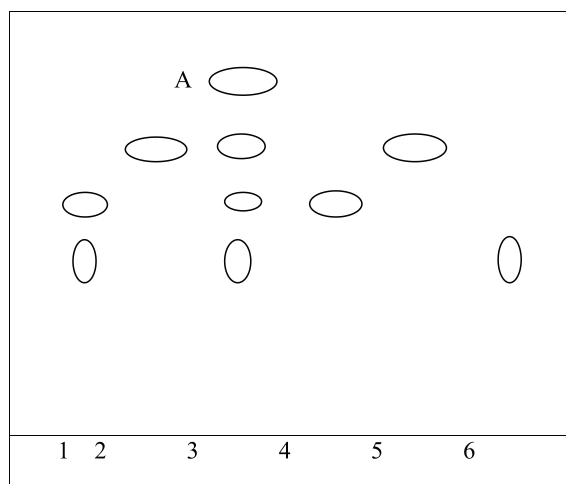


Рис. 2. Хроматограмма после термического разложения в течение 24 часов; 1 – КАС после термической обработки; 2 – ДН после термической обработки; 3 – смесь после термической обработки; А – новое пятно ($R_f = 0,9$); 4 – СО КАС ($R_f = 0,71$); 5 – СО ДН ($R_f = 0,81$); 6 – СО КС ($R_f = 0,49$)

Установлено, что кислота ацетилсалициловая подвергается деструкции раньше, чем диклофенак натрия, поэтому появление дополнительного пятна кислоты салициловой (продукта разложения КАС) может быть критерием для оценки качества суппозитория.

Таким образом, метод тонкослойной хроматографии позволяет доказать специфичность данной методики и идентифицировать диклофенак натрия, кислоту аце-

тилсалициловую и продукт деструкции КАС – кислоту салициловую.

Построенные для подтверждения линейности методик градуировочные графики приведены на рис. 3 и 4.

Значение коэффициента корреляции для обоих лекарственных веществ имеет величину 0,999, что подтверждает линейную зависимость функции от аргумента и коррелируется с допустимым значением коэффициента

корреляции, который должен быть $\geq 0,99$. Рассчитанное уравнение градуировочного графика и значение коэффициента корреляции подтверждают линейность методики.

Результаты определения значимости коэффициента a в уравнении градуировочного графика приведены в табл. 1, а прецизионности – в табл. 2 и 3.

Градуировочный график диклофенака натрия (276 нм)

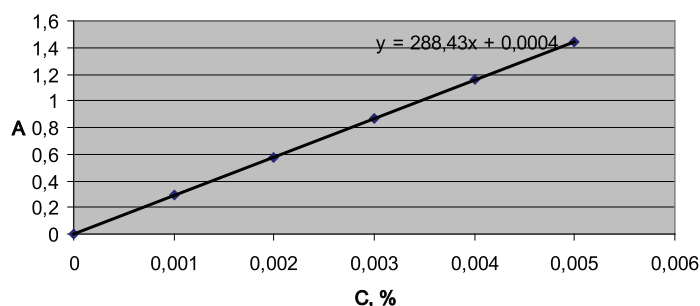


Рис. 3. Градуировочный график ДН (коэффициент корреляции 0,999)

Градуировочный график КАС (295 нм)

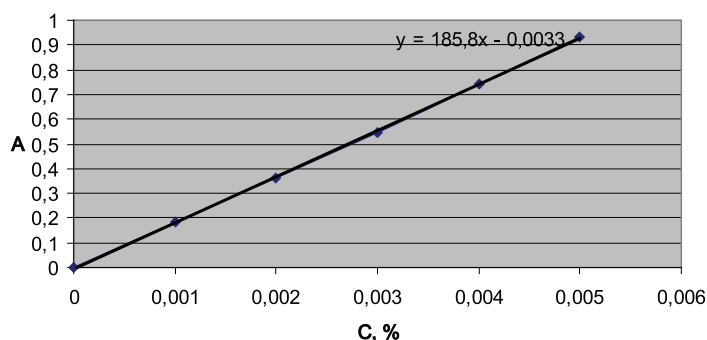


Рис. 4. Градуировочный график КАС (коэффициент корреляции 0,999)

Таблица 1

Результаты оценки коэффициента a

Лекарственное вещество	Значение коэффициента a	SD	t_a	$t_{\text{табл}}$
Диклофенак натрия	288,3	1,069	97,07	2,78
Кислота ацетилсалициловая	185,7	1,059	63,2	

Таблица 2

Результаты определения прецизионности анализа КАС в суппозиториях

Уровень	A_{276}	A_{295}	Навеска, г	P, г	Найдено, мкг/мл	Найдено в суппозитории, г	Метрологические характеристики
1	0,256	0,240	1,5502	2,0024	0,000749	0,0484	$\bar{X} = 0,0500$ $RS = 0,00106$ $RSD = 2,13\%$
1	0,260	0,243	1,5516		0,000764	0,0493	
1	0,252	0,238	1,5488		0,000756	0,0489	
2	0,341	0,319	2,0014		0,001004	0,0502	
2	0,345	0,325	2,0181		0,001030	0,0510	
2	0,348	0,329	2,0485		0,001046	0,0511	
3	0,425	0,403	2,5014		0,001279	0,0512	
3	0,421	0,399	2,4995		0,001268	0,0508	
3	0,416	0,391	2,4973		0,001230	0,0493	

Таблица 3

Результаты определения прецизионности анализа ДН в суппозиториях

Уровень	A ₂₇₆	A ₂₉₅	Навеска, г	P, г	Найдено, мкг/мл	Найдено в суппозитории, г	Метрологические характеристики
1	0,256	0,240	1,5502	2,0024	0,000747	0,0482	$\bar{X} = 0,0489$ $SD = 0,000835$ $RSD = 1,71\%$
1	0,260	0,243	1,5516		0,000759	0,0490	
1	0,252	0,238	1,5488		0,000733	0,0475	
2	0,341	0,319	2,0014		0,000995	0,0498	
2	0,345	0,325	2,0181		0,001004	0,0498	
2	0,348	0,329	2,0485		0,001011	0,0493	
3	0,425	0,403	2,5014		0,001234	0,0494	
3	0,421	0,421	2,4995		0,001220	0,0489	
3	0,416	0,416	2,4973		0,001212	0,0486	

Из табл. 1 следует, что рассчитанное значение t-критерия больше табличного, следовательно, коэффициент α незначим.

Из табл. 2 и 3 следует, что относительное стандартное отклонение анализа КАС и ДН в суппозиториях составляет соответственно

2,13 и 1,71% и не превышает допустимое стандартное отклонение (не более 3,7%), что подтверждает прецизионность методики.

Результаты определения внутрилабораторной воспроизводимости проведены по критерию Фишера (табл. 4 и 5).

Таблица 4

Результаты определения внутрилабораторной воспроизводимости анализа кислоты ацетилсалициловой

№ п/п	Найдено, г			
	1-й аналитик	Метрологические характеристики	2-й аналитик	Метрологические характеристики
1	0,0502	$SD = 0,00117$ $RSD = 2,35\%$	0,0492	$SD = 0,00132$ $RSD = 2,66\%$
2	0,0510		0,0498	
3	0,0511		0,0512	
4	0,0490		0,0515	
5	0,0486		0,0482	
6	0,0485		0,0488	
	$\bar{X} = 0,0498$		$\bar{X} = 0,0503$	
Критерий Фишера $F = 1,13 F_{(99;5;5)} = 10,97$				

Таблица 5

Результаты определения внутрилабораторной воспроизводимости результатов анализа диклофенака натрия

№ п/п	Найдено, г			
	1-й аналитик	Метрологические характеристики	2-й аналитик	Метрологические характеристики
1	0,0498	$SD = 0,000611$ $RSD = 1,22\%$	0,0495	$SD = 0,00147$ $RSD = 2,96\%$
2	0,0498		0,0491	
3	0,0493		0,0515	
4	0,0497		0,0514	
5	0,0511		0,0482	
6	0,0501		0,0484	
	$\bar{X} = 0,0500$		$\bar{X} = 0,0497$	
Критерий Фишера $F = 2,43 F_{(99;5;5)} = 10,97$				

Из табл. 4 и 5 следует, что $F \leq F_{(99;5;5)}$. Различие дисперсий S_1^2 и S_2^2 не может быть признано значимым с вероятностью $P = 99$,

что позволяет сделать заключение о воспроизводимости результатов анализа обоих аналитиков.

В табл. 6 и 7 приведены результаты определения правильности методик.

Полученные результаты открываемости находятся в пределах 98–102% и под-

тверждают достаточную степень близости результатов и, следовательно, правильность методики.

Таблица 6

Результаты определения правильности анализа кислоты ацетилсалициловой

A_{276}	A_{295}	Найдено		
		в мкг/мл	в г	R, %
0,367	0,411	0,001506	0,0753	100,4
0,365	0,409	0,001499	0,0749	99,8
0,368	0,413	0,001515	0,0758	101,1
0,394	0,503	0,002005	0,1003	100,3
0,392	0,505	0,002023	0,1012	101,2
0,391	0,499	0,001988	0,09938	99,4
0,420	0,595	0,002506	0,1253	100,2
0,415	0,592	0,002503	0,1215	100,1
0,410	0,588	0,002491	0,1246	99,6

Таблица 7

Результаты определения правильности анализа диклофенака натрия

A_{276}	A_{295}	Найдено		
		в мкг/мл	в г	R, %
0,485	0,386	0,001493	0,0747	99,6
0,484	0,384	0,001489	0,07452	99,3
0,481	0,383	0,001479	0,0740	98,7
0,629	0,454	0,001990	0,0995	99,5
0,627	0,452	0,001984	0,09927	99,3
0,631	0,453	0,00200	0,10002	100,0
0,743	0,521	0,002489	0,1244	99,5
0,774	0,519	0,002493	0,1247	99,8
0,779	0,520	0,002510	0,1256	100,5

Выводы

Полученные результаты подтверждают валидность разработанных методик анализа диклофенака натрия и кислоты ацетилсалициловой и возможность их использования для анализа ингредиентов суппозиторий указанного состава.

Список литературы

1. Аладышева Ж.И. Практические аспекты работ по валидации аналитических методик / Ж.И. Аладышева, В.В. Беляев, В.В. Береговых. // Фармация. – 2008. – № 7. – С. 9–14.
2. Арзамасцев А.П. Валидация аналитических методов. / А.П. Арзамасцев, Н.П. Садчикова, Ю.Я. Харитонов // Фармация. – 2006. – № 4. – С. 8–12.
3. Руководство ICH «Валидация аналитических методик. Содержание и методология Q2(R1)» / Фармация. – 2008. – № 4. – С. 3–10.
4. Саенко А.Ю. Использование метода тонкослойной хроматографии для анализа суппозиторий с диклофенаком натрия и кислотой ацетилсалициловой // Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы: материалы IX Междунар. конф. 1–2 апр. 2011 г. – Минск: Изд. центр БГУ, 2011. – С. 396–398.
5. Саенко А.Ю. Разработка технологии и анализ суппозиторий с диклофенаком натрия и кислотой ацетилсалициловой / А.Ю. Саенко, И.Я. Куль // Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы: материалы VIII Междунар. конф. 2–3 апр. 2010 г. – Минск: Изд. центр БГУ, 2010. – Ч. 2. – С. 177–180.

References

1. Aladysheva, Z.I. Prakticheskie aspekty rabot po validatsii analiticheskikh metodik / Z.I. Aladysheva, W.W. Belyaev, W.W. Beregovykh // Farmatsiya. – 2008. – № 7. – S. 9-14.
2. Arzamastsev A.P. Validatsiya analiticheskikh metodov / A.P. Arzamastsev, N.P. Sadchikova, Yu.Ya. Kharitonov // Farmatsiya. 2006. no. 4. pp. 8–12.
3. Rukovodstvo ICH «Validatsiya analiticheskikh metodik. Soderzhanie i metodologiya Q2(R1)» // Farmatsiya. 2008. no. 4. pp. 3–10.
4. Saenko A.Yu., Ispolzovanie metoda tonkosloynoy khromatografii dlya analiza suppozitoriev s diklofenakom natriya i kislotoy atsetilsalitsilovoy // Mediko-sotsialnaya ekologiya lichnosti: sostoyanie i perspektivy: materialy IX Mezhdunar. konf. 1–2 apr. 2011 g. Minsk: Izd. Tsentr BGU, 2011. pp. 396–398.
5. Saenko A.Yu. Razrabotka tekhnologii i analiz suppozitoriev s diklofenakom natriya i kislotoy atsetilsalitsilovoy / A.Yu. Saenko, I.Ya. Kul // Mediko-sotsialnaya ekologiya lichnosti: sostoyanie i perspektivy: materialy VIII Mezhdunar. konf. 2–3 apr. 2010 g. Minsk: Izd. Tsentr BGU, 2010. CH. 2. pp. 177–180.

Рецензенты:

Кодониди И.П., д.фарм.н., доцент кафедры органической химии, Пятигорский медико-фармацевтический институт, филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск;

Андреева И.Н., д.фарм.н., профессор кафедры туризма, институт сервиса и технологий (филиала) ДГТУ, г. Пятигорск.

Работа поступила в редакцию 10.10.2013.