

Рекомендована д-м фармац. наук, проф. І. А. Мазуром

УДК 543.554: 615.451.2:547.295.1

РОЗРОБКА І ВАЛІДАЦІЯ ПОТЕНЦІОМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ СУМИ ОРГАНІЧНИХ КИСЛОТ У НАСТОЙЦІ ВАЛЕРІАНИ

©Л. В. Вронська

Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського

Резюме: розроблено потенціометричну методику кількісного визначення суми органічних кислот у настійці валеріани. Досліджено лінійність, правильність і прецизійність запропонованої методики. Встановлено, що вміст суми органічних кислот у настійках валеріани вітчизняного виробництва становить більше 0,2 %.

Ключові слова: настійка валеріани, потенціометричне титрування, валідація, стандартизація.

Вступ. Для стандартизації рослинних лікарських засобів (ЛЗ) найбільш відповідними є придатними є високоселективні хроматографічні методи, використання яких широко передбачається в монографіях останніх редакцій провідних фармакопей світу і специфікаціях виробників для контролю якості лікарської рослинної сировини (ЛРС), рослинних препаратів і ЛЗ [1-5]. Однією з переваг цих методів є можливість одночасної ідентифікації і кількісного визначення біологічно активних речовин (БАР) або маркерів без тривалих і працемістких операцій розділення, концентрування і виділення. Разом з тим висока роздільна здатність цих методів створює, в окремих випадках, труднощі при аналізі та інтерпретації одержаних результатів. Але навіть порівняльне використання, без розшифрування, одержаних цими методами хроматограм за принципом "відбитків пальців", дозволяє вирішувати більшість вищезазначених завдань зі встановлення тотожності ЛЗ рослинного походження. Разом з тим, не знаючи тієї/того БАР/маркера, які б відповідали за біологічну активність ЛЗ, раціонально застосовувати сумарні фізико-хімічні методи кількісного визначення, як от спектрофотометрія, титриметрія. Саме цим підходом для

розробки методики кількісного визначення БАР у настійці валеріани ми скористалися.

Вітчизняні виробники контролюють у настійці валеріани кількісний вміст суми органічних кислот у перерахунку на кислоту валеріанову, починаючи практично від моменту її виробництва [6]. Для аналізу використовують кислотно-основне титрування з фенолфталеїном або пряме, або зворотне після лужного гідролізу естерів. В обох випадках спільним недоліком є, по-перше, фіксація кінцевої точки титрування, а не точки еквівалентності, по-друге, встановлення кінцевої точки титрування є дуже утруднене: червоно-коричневе забарвлення розчину повинно змінитись на малиново-рожеве. Стратегічний напрямок титриметричних методик у Європейській фармакопеї (і, відповідно, в ДФУ) – повна відмова від індикаторного титрування і перехід на потенціометричне титрування.

Тому метою нашої роботи була розробка методики кількісного визначення суми органічних кислот у настійці валеріани із заміною індикаторного титрування на фізико-хімічне.

Методи дослідження. Дослідження проводили на 10 зразках настійки валеріани 5 вітчизняних виробників (табл. 1).

Таблиця 1. Перелік настійок валеріани, використаних для кількісного визначення суми органічних кислот

№ зразка	Виробник	№ серії	Термін придатності
1	ВАТ "Тернофарм"	70509	VI.2014
2	ВАТ "Тернофарм"	60410	05.15
3	ВАТ "Тернофарм"	100510	06.15
4	ЗАТ Фармацевтична фабрика "Віола"	310610	06/15
5	ЗАТ Фармацевтична фабрика "Віола"	380710	07/15
6	ЗАТ Фармацевтична фабрика "Віола"	420810	08/15
7	ВАТ "Фітофарм", м. Артемівськ	151010	X 2015
8	ТОВ ДКП "Фармацевтична фабрика", м. Житомир	250409	04.14
9	ДП "Агрофірма Ян" ПП "Ян"	320710	07.15
10	ДП "Агрофірма Ян" ПП "Ян"	380810	08.15

Приготування стандартного розчину натрій гідроксиду та його стандартизацію виконували відповідно до вимог ДФУ [2].

Для потенціометричних вимірювань використовували мікропроцесорний рН/іон-метр AI 123 (Україна) (індикаторний електрод – скляний, електрод порівняння – хлорсрібний) та автоматичний титратор T-50 Mettler Toledo із застосуванням електроду DGI 111-SC (для водних розчинів (Mettler Toledo)).

Встановлення точки еквівалентності виконували шляхом її фіксації за кривими $E-V_T$, $pH-V_T$, $DE/DV-V_T$, $\Delta pH/\Delta V-V_T$. При ручному режимі вимірювання значення потенціалу або рН попередньо розраховували і будували відповідно інтегральні та диференціальні криві титрування.

Результати й обговорення. Попередньо було досліджено вплив кількості доданої до настійки води на прецизійність встановлення точки еквівалентності. Класично, відповідно до вимог ДФ Х, до 10 мл настійки додають 150 мл води і титрують 0,1 моль/л розчином натрій гідроксиду в присутності фенолфталеїну. Дода-

вання такої кількості води невиправдане і шкідливе через: збільшуючи об'єм розчину, зменшують у ньому концентрацію визначуваних органічних, і так за власною природою, слабких кислот. Для кривої титрування слабкої кислоти стрибок титрування є обмеженим і невеликим, тому вибір індикатора також дуже обмежений. Додаючи воду і розбавляючи визначуваний розчин у більш ніж 15 разів, зменшують величину стрибка титрування аж до його зникнення, що практично унеможливорює вибір індикатора і, власне, саму фіксацію кінцевої точки титрування. Але пояснення цьому розбавленню є: без розведення розчину водою на темному червоно-бурому забарвленні настійки ніколи не побачити кінцевої точки титрування.

Тому ми попередньо дослідили, як впливає кількість доданої води на вигляд кривої титрування і на прецизійність встановлення точки еквівалентності. На рисунку 1 наведені криві потенціометричного титрування 10 мл настійки, а також криві її титрування після попереднього додавання до неї 10 і 20 мл води відповідно.

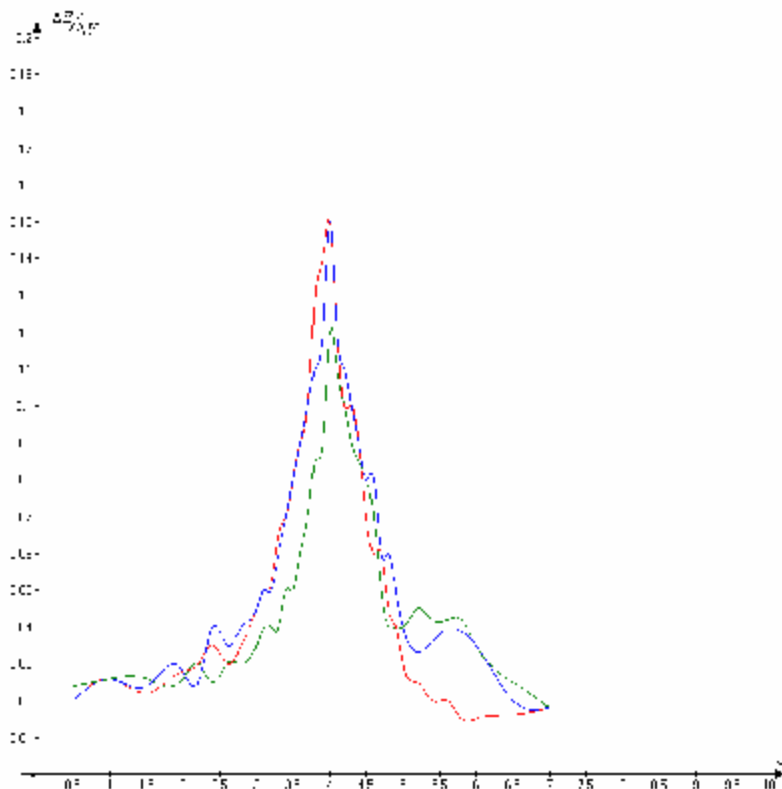


Рис. 1. Диференціальні криві потенціометричного титрування настійки валеріани: 1 – настійка валеріани, 2 – настійка валеріани з додаванням 10 мл води, 3 – настійка валеріани з додаванням 20 мл води. Вміст суми органічних кислот у перерахунку на валеріанову становить 0,327 %.

Як видно з рисунка 1, додавання води не впливає на прецизійність встановлення точки еквівалентності, вона відповідає одному й тому ж об'єму титранта. Вигляд диференціальної кривої в усіх трьох випадках є аналогічним. Тому при розробці титриметричної методики ми зупинили вибір на додаванні 20 мл води, тоді при загаль-

ному об'ємі досліджуваного розчину 30 мл електроди будуть добре занурені у розчин.

У вибраних умовах титрування було проведено визначення вмісту кислот для цієї ж настійки, але з побудовою диференціальної кривої титрування в координатах $\Delta pH/\Delta V - V$ (рис. 2).

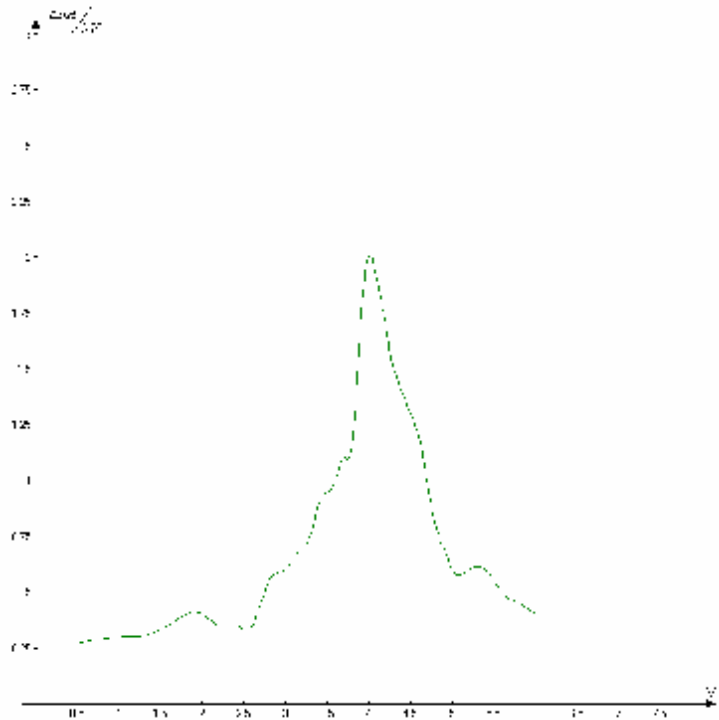


Рис. 2. Диференціальна крива потенціометричного титрування настойки валеріани. Вміст суми органічних кислот у перерахунку на валеріанову становить 0,327 %.

Як видно з рисунка 2, вимірювання рН розчину в процесі титрування та наступний розрахунок і побудова диференціальної кривої титрування не змінили вигляд кривої і не вплинули на прецизійність встановлення точки еквівалентності. Таким чином, при потенціометричному титруванні настойки валеріани можна проводити вимірювання зміни потенціалу або зміни рН розчину в процесі додавання титранта.

На даний час потенціометричне титрування є автоматизованим. Для цього застосовуються ав-

томатичні титратори, у яких подача і вимірювання об'єму титранта, розрахунок і побудова кривих титрування у бажаних координатах, і навіть розрахунок вмісту, є автоматичними, що дозволяє відкинути суб'єктивізм і можливі похибки вимірювання об'єму титранта чи значення рН або потенціалу. Нами проаналізована така ж серія настойки шляхом титрування на автоматичному титраторі і визначено вміст суми органічних кислот у перерахунку на валеріанову. Відповідні криві титрування зображені на рисунку 3.

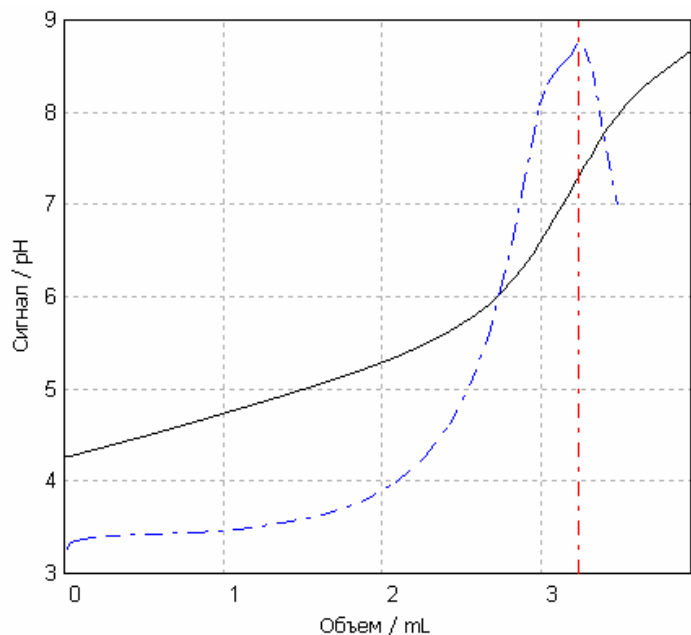


Рис. 3. Диференціальна крива потенціометричного титрування настойки валеріани. Вміст суми органічних кислот у перерахунку на валеріанову становить 0,330 %.

Як видно з рисунка 3, інтегральна і диференціальна криві титрування дозволяють чітко встановити точку еквівалентності. А різниця визначення кількісного вмісту при титруванні титрантами з різною концентрацією, у різні дні і на різному обладнанні прирівнюється до визначення відтворюваності методики, тобто визначення/встановлення точності міжлабораторного експерименту.

Таблиця 2. Результати вивчення впливу розбавлення настойки валеріани на прецизійність встановлення точки еквівалентності

V настойки, мл	V доданої води, мл	V _T , мл	Вміст суми кислот, %
10	10	3,156	0,332
10	20	3,157	0,332
10	30	3,148	0,331
10	40	3,108	0,327
10	50	3,112	0,328
		$\bar{V} = 3,136$	$W = 0,330$

Таким чином запропонована методика може застосовуватись для об'єктивного визначення вмісту суми органічних кислот у настойці валеріани. Детальні умови її застосування описані нижче.

Методика кількісного визначення суми органічних кислот у настойці валеріани. 10 мл препарату поміщають в стакан для титрування, додають 20 мл води і титрують 0,1 моль/л розчином натрій гідроксиду потенціометрично, застосовуючи скляний з водневою функцією електрод індикаторний і хлорсрібний, як електрод порівняння. При застосуванні автоматичного титратора застосовують електрод DGI 111-SC (Mettler Toledo) або аналогічний для водних розчинів з діапазоном вимірювання pH від 0 до 14.

Вміст суми органічних кислот (X) у перерахунку на валеріанову розраховують, використовуючи дані титрування, за формулою:

$$X = \frac{V_T \cdot K_n \cdot 0,01021}{V} \cdot 100,$$

де X – масово-об'ємна частка суми органічних кислот у препараті, у %;

Таблиця 3. Вміст суми органічних кислот у настойках валеріани різних виробників за результатами потенціометричного титрування (n=5, P=0,95)

№ зразка	Вміст, %
1	0,433 ± 0,003
2	0,227 ± 0,003
3	0,328 ± 0,002
4	0,212 ± 0,002
5	0,210 ± 0,002
6	0,321 ± 0,003
7	0,207 ± 0,002
8	0,398 ± 0,003
9	0,319 ± 0,003
10	0,211 ± 0,002

Отримана відносна похибка (від середнього арифметичного) становить 0,46 %, що задовольняє критеріальні фармакопейні вимоги.

Додатково було досліджено вплив кількості доданої води на точність встановлення точки еквівалентності при автоматичному титруванні із застосуванням електрода DGI 111-SC (Mettler Toledo). Результати визначення наведені у таблиці 2.

V_T – об'єм 0,1 моль/л розчину натрій гідроксиду, витраченого на титрування, в мл;

V – об'єм препарату, взятого для аналізу, в мл;

K_n – коефіцієнт поправки до концентрації розчину натрій гідроксиду;

0,01021 – титр 0,1 моль/л розчину натрій гідроксиду за валеріановою кислотою.

Результати визначення вмісту суми органічних кислот у настойках валеріани різних виробників, визначені за запропонованою методикою, наведено у таблиці 3. Як випливає з представлених даних, усі зразки настоек валеріани витримують вимоги ДФ X за показником "Кількісне визначення" – не менше 0,2 % у перерахунку на кислоту валеріанову.

Кожна методика повинна бути провалідована. Титриметрія, на відміну від багатьох фізичних і фізико-хімічних методів аналізу, є неспецифічним методом кількісного визначення. Тому завдання валідації кількісних титриметричних методик – переконатися у тому, що в процесі титрування результати кількісного визначення отримуються з необхідною точністю і прецизій-

ністю та не виходять за регламентовані допуски, наприклад $\pm 1\%$. Інші речовини, присутні у субстанції або ГЛЗ, як домішки або що, також можуть титруватись, але їхній вплив не повинен спотворювати загальний результат визначення – результати не повинні виходити за регламентовані допуски.

Таким чином, при валідації запропонованої методики нами досліджувались наступні валідаційні характеристики: лінійність, правильність і прецизійність.

При вивченні характеристики лінійності досліджували діапазон 50-150 % від номінального вмісту, тобто для титрування відбирали аліквоти об'ємом 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14 і 15 мл, які

зважували на аналітичних вагах для точнішого переведення у нормалізовані координати. До кожної проби додавали необхідну кількість води до загального об'єму розчину 30 мл. Отримані проби титрували, вимірювали об'єм титранту, витраченого на титрування, та розраховували вміст суми органічних кислот. Результати вимірювань та розрахунків представлені у таблиці 4. Проведення розрахунків та висунення критеріальних вимог здійснювали відповідно до [7].

Виходячи зі значень коефіцієнта кореляції та виконання критеріальних вимог щодо правильності регресійної прямої, можна стверджувати про виконання лінійності і прийнятність методики за цією характеристикою.

Таблиця 4. Результати дослідження валідаційних характеристик методики кількісного визначення суми органічних кислот

№ за/п	V _{із} , мл	V _{і,норм} , %	V _{Т,вимір} , мл	V _{Т,норм} , %	Критеріальні вимоги і прийнятність	
1	5	50,10	2,038	49,98	Рівняння прямої: $V_{Т,норм} = 1,0019 \cdot V_{і,норм} - 0,1575$ Тангенс кута нахилу: $b = 1,0019$ Точка перетину з віссю ординат: $a = -0,1575$ Коефіцієнт кореляції: $r = 0,99999$	
2	7	69,95	2,856	70,06		
3	8	79,96	3,258	79,92		
4	9	90,09	3,674	90,12		
5	10	100,00	4,077	100,00		
6	11	110,05	4,485	110,00		
7	12	120,10	4,901	120,20		
8	14	139,85	5,710	140,05		
9	15	148,95	6,076	149,03		
Коефіцієнт кореляції: $r = 0,99999$					$r > 0,99894$	виконується
Правильність регресійної прямої δ_{RL} : $\delta_{RL, 80} = 0,3869$ $\delta_{RL, 120} = 0,3213$					$\delta_{RL} \leq 1,0667$	Виконується за критерієм практичної незначущості
Статистична незначущість $a = -0,1575$ $ b - 1 = 0,0019$					$\leq 0,7777$ $\leq 0,0074$	Виконується за критеріями статистичної незначущості

Для всіх точок прямої виконуються критерії статистичної і практичної незначущості систематичної похибки, тому приймається рішення про витримування для даної методики правильності і прецизійності.

Таким чином, розроблена методика може застосовуватись для аналізу настоек валеріани та її рідких екстрактів. Узагальнюючи отримані результати кількісного визначення та враховуючи стан вітчизняного фітохімічного виробництва, раціонально залишити показником добро-

якості настоек валеріани при її стандартизації сумарний вміст суми органічних кислот з кількісним критерієм – не менше 0,2 %.

Висновки. Розроблена потенціометрична методика кількісного визначення суми органічних кислот у настоек валеріани. Досліджено її лінійність, правильність і прецизійність. Встановлено, що проаналізовані зразки настоек валеріани вітчизняних виробників містять більше 0,2 % органічних кислот у перерахунку на валеріанову.

Література

1. Аналіз методів стандартизації кореневищ із кореня валеріани та препаратів на їх основі за вмістом діючих речовин / О. В. Середя, Л. О. Середя, В. О. Бовтенко [та ін.] // Фармаком. – 2007. – № 2. – С. 41 – 54.
2. Державна Фармакопея України. – 1-ше вид. – Х.:

PIPEГ, – 2001. – 556 с.

3. Державна Фармакопея України. Доповнення 2. – Х.: PIPEГ, 2008. – 603 с.

4. European Pharmacopoeia 7-ed. Electronic version – 3357 р.

5. Сур С. В. Методологія оцінки якості рослинних лікарських засобів на підставі результатів, одержаних за допомогою сучасних аналітичних методик / С. В. Сур // Фармацевтичний журнал. – 2002. – № 3. – С. 64 -70.
6. Государственная Фармакопея СССР. – X-е изд. –

М.: Медицина, 1968. – 1076 с.

7. Стандартизированная процедура валидации количественных методик титрования лекарственных средств / А. И. Гризодуб, Д. А. Леонтьев, С. О. Чикалова [и др.] // Фармаком. – 2009. – № 2. – С. 5 – 29.

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ В НАСТОЙКЕ ВАЛЕРИАНЫ

Л. В. Вронска

Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского

Резюме: разработана потенциометрическая методика количественного определения суммы органических кислот в настойке валерианы. Исследовано линейность, правильность и прецизионность предложенной методики. Установлено, что содержание суммы органических кислот в настойках валерианы отечественного производства составляет более 0,2 %.

Ключевые слова: настойка валерианы, потенциометрическое титрование, валидация, стандартизация.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF POTENTIOMETRIC METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF ORGANIC ACIDS AMOUNT IN VALERIAN TINCTURE

L. V. Vronska

Ternopil State Medical University by I. Ya. Horbachevsky

Summary: potentiometric method of quantitative determination of the organic acids amount in the valerian tincture was developed. Linearity, accuracy and precision of the proposed method was investigated. It was established that the amount of organic acid content in valerian tinctures of domestic production amounts is more than 0.2 %.

Key words: tincture of valerian, potentiometric titration, validation, standardization.