

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, ФАРМАКОГНОЗИЯ (14.04.02)
PHARMACEUTICAL CHEMISTRY, PHARMACOGNOSY (14.04.02)

УДК 614.272, 615.074

DOI: <https://doi.org/10.17816/2072-2354.2020.20.3.151-156>

МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИОСМИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ

А.В. Воронин, М.Н. Качалкин, А.В. Карпов

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Самара

Для цитирования: Воронин А.В., Качалкин М.Н., Карпов А.В. Метрологические характеристики методики количественного определения диосмина в лекарственных препаратах // Аспирантский вестник Поволжья. – 2020. – № 5–6. – С. 151–156. DOI: <https://doi.org/10.17816/2072-2354.2020.20.3.151-156>

Поступила: 22.05.2020

Одобрена: 16.07.2020

Принята: 14.09.2020

▪ **Введение.** В РФ зарегистрировано ряд лекарственных препаратов на основе фармацевтической субстанции диосмина. Для контроля качества лекарственных препаратов необходимы простые и информативные методы анализа.

Цель исследования — определение метрологических характеристик методики количественного определения диосмина методом спектрофотометрии в некоторых лекарственных препаратах.

Материалы и методы. Объектами исследования были лекарственные препараты на основе фармацевтической субстанции диосмина: «Венарус», «Детралекс» (таблетки, суспензия), «Флебофа». Для количественного определения использовали метод спектрофотометрии в УФ-диапазоне. Значения удельных показателей поглощения диосмина при длинах волн 268 и 370 нм определяли по параметрам градуировочных зависимостей. Статистическую обработку аналитических данных осуществляли методами вариационной статистики, корреляционного, однофакторного дисперсионного анализа с применением компьютерных программ ChemMetr 1.0, ChemMetr Evaluation 1.0, Statistica 6.0 (Statsoft Inc., USA).

Результаты. Рабочий диапазон методики спектрофотометрического определения диосмина составил для аналитических длин волн: 268 нм — 0,0001–0,001 %, 370 нм — 0,0002–0,002 %. Значения удельных показателей поглощения диосмина при длинах волн 268 и 370 нм в растворе натрия гидроксида концентрации 0,02 моль/л составили $463,0 \pm 24,6$ и $259,0 \pm 9,9$ соответственно. Величина относительной ошибки при определении среднего значения содержания диосмина в лекарственных препаратах находилась в диапазонах: 8–12 % — для аналитической длины волны 268 нм и 6–8 % — для 370 нм. На примере анализа таблеток «Детралекс» нами был выполнен прогностический расчет относительной ошибки (погрешности) степени извлечения диосмина (пробоподготовки), она составила 8 %.

Заключение. Установлены величины вкладов в относительную ошибку методики количественного определения удельных показателей поглощения диосмина, а также степени извлечения диосмина из анализируемых лекарственных форм (на примере анализа таблеток «Детралекс»). Расчетные алгоритмы могут использоваться для теоретической оценки погрешности пробоподготовки для других многокомпонентных объектов анализа в контроле качества лекарственных средств.

▪ **Ключевые слова:** диосмин; УФ-спектрофотометрия; метрологические характеристики; количественное определение; удельный показатель поглощения.

THE METROLOGICAL PARAMETERS OF DIOSMIN QUANTITATION IN PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS

A.V. Voronin, M.N. Kachalkin, A.V. Karpov

Samara State Medical University, Samara, Russia

For citation: Voronin AV, Kachalkin MN, Karpov AV. The metrological parameters of diosmin quantitation in pharmaceutical dosage forms. *Aspirantskiy Vestnik Povolzh'ya*. 2020;(5-6):151–156. DOI: <https://doi.org/10.17816/2072-2354.2020.20.3.151-156>

Received: 22.05.2020

Revised: 16.07.2020

Accepted: 14.09.2020

▪ **Introduction.** Pharmaceutical dosage forms with diosmin are allowed for medical use in Russian Federation. Simple and informative methods of diosmin quantitation for drug quality control are needed.

Aim: determination of metrological parameters of diosmin quantitation in pharmaceutical dosage forms by UV-spectrophotometry.

Materials and methods. The study subjects Venarus[®], Detralex[®] (tablets, suspension), Phlebopha[®]. Diosmin were quantified by UV-spectrophotometry. The reference-specific absorbance values of diosmin at wavelengths of 268 and 370 nm by the parameters of calibration were determined. Statistical data processing was carried out by the methods of variation statistics, correlation, one-way analysis of variance using computer programs ChemMetr 1.0, ChemMetr Evaluation 1.0, Statistica 6.0 (Statsoft Inc., USA).

Results. The range of diosmin quantitation by UV-spectrophotometry was revealed for the wavelength of 268 nm — 0,0001-0,001%, 370 nm — 0,0002-0,002%. The reference-specific absorbance values for diosmin at the wavelength of 268 and 370 nm in a sodium hydroxide solution 0,02M were $463,0 \pm 24,6$ and $259,0 \pm 9,9$ respectively. The mean errors of diosmin concentrations in pharmaceutical dosage forms were revealed for the wavelength of 268 nm — 8-12% and for 370 nm — 6-8%. Prognostic calculation of the sample preparation error (extraction) for diosmin was performed using the example of Detralex[®] tablets. The sample preparation error was 8%.

Conclusion. The values components of error for reference-specific absorbance value and sample preparation error for diosmin quantitation were determined (as exemplified by the study of Detralex[®] tablets). Calculation algorithms can be used for error estimation of sample preparation for other multicomponent samples in drug quality control.

▪ **Keywords:** diosmin; UV-spectrophotometry; metrological parameters; quantitation; reference-specific absorbance value.

Введение

В РФ зарегистрирован ряд лекарственных препаратов на основе фармацевтической субстанции диосмина (3',5,7-тригидрокси-4'-метоксифлавонон-7-рутинозид) [1]. Для контроля качества большинства из них соответствующие фармакопейные статьи предлагают количественное определение основного действующего вещества и специфических примесей методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Актуальным вопросом является разработка методик анализа с применением простых и доступных в рутинной практике методов анализа с приемлемыми метрологическими характеристиками [2]. В качестве альтернативного варианта количественного анализа диосмина применяют метод спектрофотометрии [3].

Цель исследования — определение метрологических характеристик методики количественного определения диосмина методом спектрофотометрии в некоторых лекарственных препаратах.

Материалы и методы

Объектами исследования были лекарственные препараты на основе фармацевтической субстанции диосмина: «Венарус», «Детралекс» (таблетки, суспензия), «Флебифа».

В качестве образца сравнения использовали фармакопейный стандартный образец диосмина (Hyderabad, Индия).

Пробоподготовку анализируемых лекарственных препаратов осуществляли путем экстракции раствором натрия гидроксида концентрации 0,02 моль/л. Для количественного определения диосмина использовали метод спектрофотометрии в УФ-диапазоне. Значения удельных показателей поглощения при длинах волн 268 и 370 нм определяли на основании параметров соответствующих уравнений градуировочных зависимостей.

Статистическую обработку аналитических данных осуществляли методами вариационной статистики, корреляционного, однофакторного дисперсионного анализа с применением компьютерных программ ChemMetr 1.0, ChemMetr Evaluation 1.0 [4, 5], а также Statistica 6.0 (Statsoft Inc., USA) [6].

Расчет теоретической величины предела сходимости RSD_r исследуемых методик количественного определения осуществляли по уравнению Горвица [7]:

$$RSD_r = 0,67 \cdot RSD_R; \quad RSD_R = 2^{1 - 0,5 \cdot \log C}; \\ C = w/100;$$

где w — концентрация анализируемого вещества в пробе, % (мас.); RSD_R — предел воспроизводимости, %, C — коэффициент концентрации.

Расчет теоретических величин стандартного отклонения $S_{\text{сред}}$ и относительной ошибки среднего значения $\varepsilon_{\text{сред}}$ исходя из величины предела сходимости RSD_r методики, осуществляли по формулам:

$$S_{\text{сред}} = (RSD_r \cdot x_{\text{сред}}) \cdot 100; \\ \Delta x = S_{\text{сред}} \cdot t(P, f); \quad \varepsilon_{\text{сред}} = (\Delta x / x_{\text{сред}}) \cdot 100,$$

где $x_{\text{сред}}$ — среднее значение содержания анализируемого вещества в пробе; $t(P, f)$ — критерий Стьюдента; Δx — полуширина доверительного интервала среднего значения содержания анализируемого вещества.

Расчет относительной ошибки (погрешности) $\varepsilon_{\text{сред}}$ методики количественного анализа диосмина осуществляли по формуле:

$$\varepsilon = \sqrt{\left(\frac{\sigma_{x1}}{x_1}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_{x2}}{x_2}\right)^2 + \dots + \left(\frac{\sigma_{xn}}{x_n}\right)^2},$$

где $\sigma_{x1}, \sigma_{x2}, \sigma_{xn}$ — значения абсолютных погрешностей измерений отдельных этапов методики количественного определения; x_1, x_2, x_n — значения измеряемых величин при реализации методики количественного определения.

Результаты и обсуждение

Выбор экстрагента для пробоподготовки анализируемых лекарственных препаратов определяется растворимостью диосмина. Диосмин практически нерастворим в воде и в этиловом спирте. Растворимость диосмина в растворах натрия гидроксида обусловлена ионизацией фенольных гидроксильных групп

(образованием фенолятов). В связи с этим для приготовления растворов стандартного образца диосмина и его экстракции из анализируемых лекарственных препаратов использовали раствор натрия гидроксида концентрации 0,02 моль/л.

Рабочий диапазон методики, в котором наблюдается линейный характер зависимости оптической плотности от концентрации диосмина, составил для аналитических длин волн: 268 нм — 0,0001–0,001 %, 370 нм — 0,0002–0,002 %.

Значения удельных показателей поглощения диосмина при длинах волн 268 и 370 нм в растворе натрия гидроксида концентрации 0,02 моль/л составили $463,0 \pm 24,6$ и $259,0 \pm 9,9$ соответственно.

Относительные ошибки вышеуказанных показателей поглощения, определенные в 5 сериях параллельных определений и влияющие на общую ошибку результатов определения, равны 5,3 и 3,8 %.

Метрологические характеристики методики количественного определения диосмина методом спектрофотометрии представлены в табл. 1.

Для всех анализируемых лекарственных препаратов наблюдали значимое отличие

Таблица 1 / Table 1

Метрологические характеристики методики количественного определения диосмина методом спектрофотометрии в некоторых лекарственных препаратах

The metrological parameters of diosmin quantitation in pharmaceutical dosage form by means of UV-spectrophotometry

Препарат / Длина волны	μ , мг%	f	$x_{\text{сред}}$, мг%	S^2	S	P	$t(P, f)$	Δx	ε , %	$\varepsilon_{\text{сред}}$, %	δ , %
Детралекс сусп. / 268 нм	0,9	9	0,92	0,021	0,15	0,95	2,26	0,33	36,06	11,40	1,79
Детралекс сусп. / 370 нм	1,8	9	1,69	0,022	0,15	0,95	2,26	0,34	19,82	6,27	5,82
Венарус / 268 нм	0,9	9	0,86	0,01	0,098	0,95	2,26	0,22	25,80	8,16	4,48
Венарус / 370 нм	0,9	9	0,89	0,011	0,10	0,95	2,26	0,24	26,38	8,34	1,10
Детралекс табл. / 268 нм	0,9	9	0,92	0,015	0,12	0,95	2,26	0,28	30,06	9,51	2,09
Детралекс табл. / 370 нм	0,9	9	0,86	0,006	0,076	0,95	2,26	0,17	20,09	6,35	5,04
Флебофа / 268 нм	0,6	9	0,60	0,011	0,10	0,95	2,26	0,24	38,99	12,33	0,29
Флебофа / 370 нм	1,2	9	1,20	0,02	0,14	0,95	2,26	0,32	26,31	8,32	0,32

Примечание. μ — истинное значение содержания диосмина в лекарственном препарате (принятое опорное значение); $x_{\text{сред}}$ — среднее значение содержания диосмина в лекарственном препарате, определенное экспериментальным путем; f — число степеней свободы; S^2 — дисперсия; S — стандартное отклонение; P — уровень доверительной вероятности; Δx — полуширина доверительного интервала среднего значения; ε — относительная ошибка (погрешность) единичного определения; $\varepsilon_{\text{сред}}$ — относительная ошибка (погрешность) среднего значения; δ — относительное отклонение среднего значения содержания диосмина в лекарственном препарате от истинного значения содержания (систематическая ошибка).

Note. μ — reference level of diosmin concentration in pharmaceutical dosage form; $x_{\text{сред}}$ — average diosmin concentration in pharmaceutical dosage form (experimental value); f — degrees of freedom; S^2 — dispersion; S — standard deviation; P — confidence level; Δx — confidence interval half-width of average diosmin concentration; ε — relative measurement error, %; $\varepsilon_{\text{сред}}$ — relative measurement error of average concentration; δ — accuracy (bias) of diosmin concentration in pharmaceutical dosage form.

Таблица 2 / Table 2

Результаты дисперсионного анализа для сравнения относительной ошибки среднего значения и систематической ошибки при определении диосмина в лекарственных препаратах методом спектрофотометрии

Findings of variance analysis for comparison of mean error and bias to quantitate diosmin by UV-spectrophotometry

Параметры	Общая дисперсия выборки $SS_{\text{общ}}$	Дисперсия эффекта $MS_{\text{эф}}$	Дисперсия межгрупповая SS	Дисперсия ошибки $MS_{\text{ошиб}}$	F-критерий	Уровень значимости p
$\varepsilon_{\text{сред } 268 \text{ нм}} / \varepsilon_{\text{сред } 370 \text{ нм}}$	18,36	18,36	14,60	2,43	7,54	0,033
$\delta_{268 \text{ нм}} / \delta_{370 \text{ нм}}$	1,65	1,65	31,91	5,32	0,31	0,60

Примечание. $\varepsilon_{\text{сред}}$ — относительная ошибка (погрешность) среднего значения; δ — относительное отклонение среднего значения содержания диосмина в лекарственном препарате от истинного значения содержания (систематическая ошибка).

Note. $\varepsilon_{\text{сред}}$ — relative measurement error of average concentration; δ — accuracy (bias) of diosmin concentration in pharmaceutical dosage form.

относительной ошибки среднего значения при двух аналитических длинах волн: при длине волны 268 нм величина ошибки определения была статистически значимо больше по сравнению с ошибкой определения при длине волны 370 нм, за исключением лекарственного препарата «Венарус».

Величина относительной ошибки при определении среднего значения содержания диосмина находилась в диапазонах: 8–12 % — для аналитической длины волны 268 нм и 6–8 % — для 370 нм.

Результаты однофакторного дисперсионного анализа подтверждают наличие статистически значимых различий для параметра «относительная ошибка среднего значения

содержания диосмина в лекарственных препаратах»: уровень значимости F-критерия был менее 0,05. Систематическая ошибка определений значимо не различалась при аналитических длинах волн 268 нм и 370 нм (табл. 2).

Анализ корреляционных зависимостей «относительная ошибка среднего значения»-«систематическая ошибка» в выборке результатов, объединенной для двух аналитических длин волн, показывает наличие высокой связи: величина коэффициента корреляции r составляет $-0,73$.

Вышеуказанные зависимости, рассчитанные для аналитических длин волн 268 нм и 370 нм, характеризуются очень высокой связью, при этом величины коэффициентов

Таблица 3 / Table 3

Метрологическая оценка ошибки методики количественного определения диосмина в таблетках «Детралекс» методом спектрофотометрии

The error evaluation of diosmin quantitation in Detrale[®] tablets by UV-spectrophotometry

№	Этап анализа	Абсолютная ошибка σ_x	Относительная ошибка $(\sigma_x/x) \cdot 100, \%$
1	Взятие точной навески 1,0 г	0,0002 г	0,020
2	Отмеривание объема 250 мл (мерная колба)	0,3 мл	0,12
3	Отбор аликвоты 1 мл (пипетка)	0,01 мл	1,00
4	Отмеривание объема 500 мл (мерная колба)	0,5 мл	0,10
5	Измерение оптической плотности при 268 нм (спектрофотометр СФ-2000)	0,004	0,93
6	Погрешность величины удельного показателя поглощения, 268 нм	–	5,30
7	Степень извлечения диосмина расчетная: программа ChemMetr Evaluation 1.0 / уравнение Горвица	–	7,95/16,60
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{сред}}$, % (без учета относительной ошибки пробоподготовки, программа ChemMetr Evaluation 1.0)			5,2
Предел сходимости расчетный RSD_r , % (уравнение Горвица)			7,7
Относительная ошибка расчетная $\varepsilon_{\text{сред}}$, % (уравнение Горвица)			17,4
Относительная ошибка $\varepsilon_{\text{сред}}$, %, определенная в ходе эксперимента			9,5

корреляции r равны $-0,94$ и $-0,98$ соответственно. Таким образом, можно предположить, что рост относительной ошибки среднего значения содержания диосмина в лекарственных препаратах связан с увеличением вклада случайных ошибок, в числе которых — ошибки пробоподготовки (варьирование степени извлечения диосмина). Следует отметить, что величина систематической ошибки определения не зависит от используемой аналитиком длины волны.

На примере анализа таблеток «Детралекс» нами был выполнен прогностический расчет относительной ошибки (погрешности) степени извлечения диосмина (пробоподготовки), который был основан на следующих принципах:

- учет минимальных уровней погрешностей каждого этапа анализа, кроме экстракции диосмина из навески таблеток;
- наличие экспериментальных данных о величине общей относительной ошибки определения диосмина;
- аддитивность квадратов относительных ошибок отдельных этапов анализа (табл. 3).

Относительная ошибка этапа пробоподготовки — степени извлечения диосмина из таблеток «Детралекс» составила 8 %. При реализации варианта расчета общей относительной ошибки анализа по алгоритму, основанному на уравнении Горвица, ее величина достигала 17 %.

Вне зависимости от используемого варианта прогностического расчета, очевидно, что наибольший вклад в погрешность методики спектрофотометрического определения диосмина в таблетках «Детралекс» вносит этап пробоподготовки.

Заключение

Таким образом, в результате исследований были определены метрологические характеристики методики количественного определения диосмина методом спектрофотометрии в ряде лекарственных препаратов. Установлены величины вкладов в относительную ошибку данной методики удельных показателей поглощения диосмина при аналитических длинах волн 268 и 370 нм, а также степени извлечения диосмина из анализируемых лекарственных форм (на примере анализа таблеток «Детралекс»). Предложенные расчетные алгоритмы могут быть реализованы для теоретической оценки погрешности пробоподготовки для других многокомпонентных объектов анализа в контроле качества лекарственных средств.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. Министерство здравоохранения РФ. Режим доступа: <https://grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx>. Дата обращения: 21.02.2020. [Gosudarstvennyy reestr lekarstvennyh sredstv [Elektronnyy resurs]: Ministerstvo zdravoohraneniya RF. (In Russ.)]. Available from: <https://grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx>. Accessed: 21.02.2020.
2. Вершинин В.И., Бриленок Н.С., Цюпко Т.Г. Методология спектрофотометрического анализа смесей органических соединений. Погрешность оценки суммарного содержания аналитов с учетом их коэффициентов чувствительности // Журнал аналитической химии. – 2012. – Т. 67. – № 7. – С. 715–721. [Vershinin VI, Brilenok NS, Syupko TG. Metodologiya spektrofotometricheskogo analiza smesey organicheskikh soedinenij. Pogreshnost' ocenki summarnogo sodержaniya analitov s uchetoм ih koefficientov chuvstvitel'nosti. *Journal of Analytical Chemistry*. 2012;67(7):715–721. (In Russ.)]
3. Srilatha D, Nasare M, Nagasandhya B, et al. Development and validation of UV spectrophotometric method for simultaneous estimation of hesperidin and diosmin in the pharmaceutical dosage Form. *ISRN Spectroscopy*. 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/534830>.
4. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № RU2017663573/07.12.17. «ChemMetr 1.0». Воронин А.В., Воронин С.В., Малкова Т.Л., Ледяев М.Е. [Svidetel'stvo o gosudarstvennoj registracii programmy dlya EVM No. RU2017663573/07.12.17. Voronin AV, Voronin SV, Malkova TL, Ledyayev ME. "ChemMetr 1.0" [Internet]: Baza patentov Rossii. Available from: <https://patentinform.ru/programs/reg-2017663573.html>. Accessed: 21.02.2020. (In Russ.)]
5. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № RU2019617347/ 06.06.19. Воронин А.В., Сынбулатов И.В., Качалкин М.Н., Воронин С.В. «ChemMetr Evaluation 1.0». Режим доступа: <https://patentinform.ru/programs/reg-2019617347.html>. Дата обращения: 21.02.2020. [Svidetel'stvo o gosudarstvennoj registracii programmy dlya EVM No. RU2019617347/06.06.19. Voronin AV, Synbulatov IV, Kachalkin MN, Voronin SV. "ChemMetr Evaluation 1.0". Available from: <https://patentinform.ru/programs/reg-2019617347.html>. Accessed: 21.02.2020. (In Russ.)]
6. Халафян А.А. Статистический анализ данных. *Statistica 6.0.: учебное пособие*. – Краснодар: КубГУ, 2003. [Halafyan AA. Statisticheskij analiz dannyh. *Statistica 6.0.: uchebnoe posobie*. Krasnodar: KubGU; 2003. (In Russ.)]
7. Lisinger Thomas PJ, Josephs Ralf D. Limitations of the Application of the Horwitz Equation. *Trends in Analytical Chemistry*. 2006;25(11):1125–1130. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2006.11.002>.

▪ Информация об авторах

Александр Васильевич Воронин — кандидат фармацевтических наук, доцент, заведующий кафедрой химии фармацевтического факультета. ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара. E-mail: dimmu2000@mail.ru.

Максим Николаевич Качалкин — ассистент кафедры химии фармацевтического факультета. ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара. E-mail: maxroso@yandex.ru.

Александр Вячеславович Карпов — студент фармацевтического факультета. ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара. E-mail: karpov.sasha111@gmail.com.

▪ Information about the authors

Alexander V. Voronin — Candidate of Pharmaceuticals Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Chemistry of Pharmaceutical Faculty. Samara State Medical University, Samara, Russia. E-mail: dimmu2000@mail.ru.

Maksim N. Kachalkin — Assistant of the Department of Chemistry of Pharmaceutical Faculty. Samara State Medical University, Samara, Russia. E-mail: maxroso@yandex.ru.

Alexander V. Karpov — Student of Pharmaceutical Faculty. Samara State Medical University, Samara, Russia. E-mail: karpov.sasha111@gmail.com.