

УДК 615.07:615.281:615.453.6

Л.О. БОБРИЦЬКА, О.С. НАЗАРОВА

*Національний фармацевтичний університет**Державне підприємство**«Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції»*

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ТАБЛЕТОК З ВАЛАЦИКЛОВІРОМ

Розроблена методика кількісного визначення валацикловіру гідрохлориду в препараті «Герпевал 500» з використанням методу спектрофотометрії. Проведені валідаційні дослідження, з використанням критеріїв прийнятності для допусків вмісту $\pm 5,0\%$, підтверджують специфічність, лінійність, прецизійність (збіжність), правильність, діапазон застосування та внутрішньолабораторну прецизійність запропонованої методики.

Ключові слова: стандартизація, протівірусний препарат, таблетки.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ

Відповідно до вимог, що пред'являються при реєстрації лікарських засобів в Європейському Співтоваристві, США і Японії, всі аналітичні методики, що включаються в аналітичну нормативну документацію, повинні бути валідовані. Крім того, валідація всіх методик, що використовуються для контролю якості лікарських засобів на всіх етапах їх виробництва, є обов'язковою вимогою GMP. Головною задачею валідації аналітичної методики є експериментальний доказ того, що дана методика придатна для досягнення тих цілей, для яких вона призначена. Послідовність розгляду валідаційних характеристик відображає процес, по якому може розроблятися і валідуватися аналітична методика.

Валідацію кількісного визначення проводять за такими характеристиками: правильність, точність, специфічність, лінійність, діапазон застосування [7].

АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

Відповідно до вимог ДФУ [2,4-6] була проведена валідація кількісного визначення валацикловіру гідрохлориду методом спектрофотометрії.

Допуски вмісту (В) валацикловіру гідрохлориду в готовій лікарській формі під час зберігання складають $\pm 5\%$, тому при проведенні валідації критеріями оцінки цієї методики були параметри для $V = 5,0\%$, тобто максимальна

невизначеність аналізу (Δ_{Δ_s}) має бути не більше $1,6\%$ [3, 8].

Дослідження проводили за основними валідаційними характеристиками: специфічність, лінійність, прецизійність (збіжність), правильність, діапазон застосування, внутрішньолабораторна прецизійність [2, 8].

ФОРМУЛЮВАННЯ ЦІЛЕЙ СТАТТІ

Метою нашої роботи є розробка і валідація методики кількісного визначення валацикловіру гідрохлориду в лікарському препараті «Герпевал 500».

ВИКЛАД ОСНОВНОГО МАТЕРІАЛУ

Об'єктом досліджень є препарат «Герпевал 500» у формі таблеток (вкритих плівковою оболонкою, виробництва ВАТ «Фітофарм», Україна), який містить в якості діючої речовини валацикловіру гідрохлорид (фірми «LIVZON GROUP CHANGZHOU KONY PHARMACEUTICAL CO., LTD», Китай). Показаннями до застосування препарату є оперізувальний герпес; лікування і профілактика (супресія) рецидивів інфекцій шкіри та слизових оболонок, спричинених вірусом Herpes simplex типів I і II (включаючи вперше виявлений і рецидивуючий генітальний герпес); лабіальний герпес; профілактика цитомегаловірусної інфекції після трансплантації органів. Препарат застосовують також для зниження ризику передачі вірусу від хворих на генітальний герпес.

У роботі використовували стандартний зразок (СЗ) валацикловіру (фірми «LIVZON GROUP

© Л.О. Бобрицька, О.С. Назарова, 2012

CHANGZHOU KONY PHARMACEUTICAL CO., LTD”, Китай) для приготування розчину порівняння [9]. Дослідження проводили з використанням аналітичного обладнання: спектрофотометр UV-VIS HP 8453 фірми «Hewlett Packard» (США), ваги BA-210S фірми «Sartorius» (Німеччина), мірний посуд класу А.

Кількісний вміст валацикловіру гідрохлориду запропоновано проводити методом спектрофотометрії, оскільки діюча речовина у підкислених водних розчинах має максимум поглинання в області хвилі (251±2) нм [1]. Оптичну густину випробовуваних розчинів вимірювали в області хвилі 251 нм, у кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи як компенсаційний розчин води Р. Паралельно вимірювали оптичну густину розчину порівняння (СЗ валацикловіру) з концентрацією 14 мкг/мл.

Нормування вмісту $C_{13}H_{20}N_6O_4$ (валацикловіру) встановлено в межах 95 % - 105 % від номінального вмісту (від 0,475 г до 0,525 г, розраховуючи на середню масу таблетки).

Для визначеності специфічності методики проводили перевірку фонового поглинання і оцінку відносної систематичної похибки (δ_{noise} (%)), яка вноситься допоміжними речовинами і можливими продуктами розкладення. Дані наведені в табл. 1.

З даних табл. 1 видно, що не виконується співвідношення $\delta_{noise} (\%) \leq \delta_{noise\ теор} (\%)$, але виконується співвідношення $\delta_{placebo} (\%) \leq 0,033 \times B$, тобто фонове поглинання є не значимим, і методика характеризується достатньою специфічністю.

Лінійність, збіжність, правильність і діапазон застосування методики визначали на модельних сумішах з відомим вмістом діючої речовини з «плацебо». Вміст аналізованої речовини був в межах від 80 до 120 % відносно номінального значення. Робоча концентрація випробовуваного розчину і розчину порівняння близько 14 мкг/мл. Встановлена лінійність залежності оптичної густини розчинів валацикловіру гідрохлориду

від концентрації в області від 11 до 17 мкг/мл (±20%). УФ-спектри для визначення лінійної залежності наведені на рис. 1. На рис. 2 наведена лінійна залежність оптичної густини від концентрації валацикловіру гідрохлориду в нормалізованих координатах.

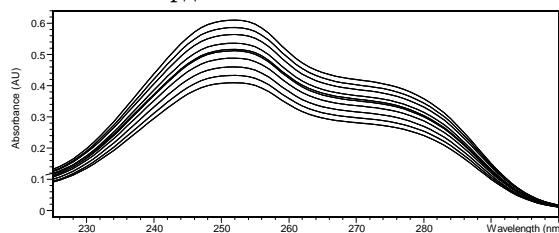


Рис. 1. УФ-спектри для визначення лінійної залежності валацикловіру гідрохлориду при проведенні валидації методики кількісного визначення

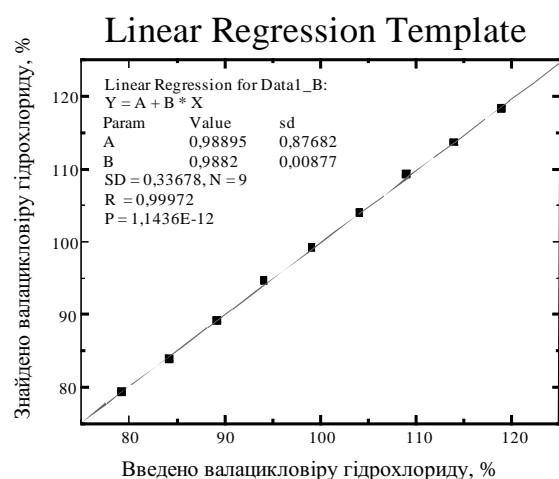


Рис. 2. Лінійна залежність оптичної густини від концентрації валацикловіру гідрохлориду в нормалізованих координатах

Розрахунок параметрів лінійної залежності $Y_i = b \times X_i + a$ (за даними табл. 3) для валацикловіру гідрохлориду був проведений методом найменших квадратів. Результати наведені в табл. 2.

Таблиця 1

**СПЕЦИФІЧНІСТЬ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ
ВАЛАЦИКЛОВІРУ ГІДРОХЛОРИДУ**

Оптична густина			Фактичне $\delta_{placebo} (\%) = \frac{A_{placebo}}{A_{st}} \cdot 100$	$\delta_{imp} (\%)$ з специфікації АНД або $\delta_{imp} (\%) = \frac{\sum A_{imp,i}}{A_s} \cdot 100\%$	Фактичне $\delta_{noise} (\%) = \delta_{noise} (\%) + \delta_{placebo} (\%) \leq$	Критерій $\delta_{noise\ теор} (\%)$
Розчин плацебо ($A_{placebo}$)	Розчин порівняння (A_{st})	Розчин домішок ($A_{imp,i}$)				
0,000125	0,537175	–	$0,022 \leq 0,033 \cdot 5 = 0,165$	зі специфікації – 0,5 % (будь-яких домішок, окрім ацикловіру)	0,022 + 0,5 = 0,522	0,51
0,000118	0,53707	–				
0,000120	0,537419	–				
Середнє $A_{placebo} = 0,000121$	Середнє $A_{st} = 0,537221$	Середнє $A_{imp,i} = -$				

**МЕТРОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЛІНІЙНОЇ ЗАЛЕЖНОСТІ
ДЛЯ ВАЛАЦИКЛОВІРУ ГІДРОХЛОРИДУ**

Величина	Значення	Критерій (для допусків 95 – 105 %, g = 9)	Висновок
b	0,9882	–	–
S _b	0,00877	–	–
a	0,98895	1) $\leq 1,895 \cdot S_a = 1,66$ 2) якщо не виконується 1), то $\leq 2,6$	Відповідає
S _a	0,87682	–	–
S _r	0,33678	–	–
r	0,99972	$\geq 0,9981$	Відповідає

Як видно з табл. 2, виконуються вимоги до параметрів лінійної залежності (a, r), тобто лінійність методики визначення валацикловіру гідрохлориду підтверджується в усьому діапазоні концентрацій (80-120 %).

Високе значення коефіцієнту кореляції для валацикловіру $r = 0,99972$, також задовольняє вимогам критерію прийнятності ($r = 0,9981$) і підтверджує лінійність залежності між «введеною» і «знайденою» кількістю досліджуваної речовини (табл. 2).

З табл. 3 видно, що для валацикловіру гідрохлориду методика аналізу характеризується достатньою прецизійністю (збіжністю). Знайдене значення відносного довірчого інтервалу величини Z (0,62) менше критичного значення для збіжності результатів (1,6 %).

Виконується критерій незначущості систематичної похибки методики – систематична похибка методики (0,17) є статистично і практично незначущою, тобто методика аналізу характеризується достатньою правильністю в усьому діапазоні концентрацій від 80 до 120 % (табл. 3).

Таким чином, підтверджена лінійність, прецизійність (збіжність) і правильність визначення валацикловіру гідрохлориду методом спектрофотометрії в діапазоні використання від 80 до 120 %.

Для оцінки внутрішньолабораторної прецизійності використовували відносний довірчий інтервал для п'яти паралельних визначень кількісного вмісту однієї серії препарату, який має бути менше максимально допустимої невизначеності результатів аналізу: $\Delta_{\bar{z}} \leq 1,6$ (при $V = 5$ %). Випробовування проводили з використанням однієї серії препарату, різними аналітиками, в різні дні, з використанням різного мірного посуду.

Внутрішньолабораторна прецизійність результатів аналізу підтверджена тим, що величина відносного довірчого інтервалу для п'яти паралельних визначень однієї серії препарату ($\Delta_{\bar{z}} = 0,960$ %) задовольняє критерію прийнятності ($\leq 1,6$ %), дані наведені в (табл. 4).

Для підтвердження коректності методики при відтворюванні в інших лабораторіях проведений прогноз повної невизначеності методики.

Прогнозуєма повна невизначеність результатів аналізу не має перевищувати максимально допустиму невизначеність результатів аналізу для допусків вмісту $\pm 5,0$ % – $\max \Delta_{As} \leq 1,6$ %.

Прогноз невизначеності пробопідготовки. Розрахунок проведений із розрахункової формули АНД з використанням підходу до допустимої невизначеності мірного посуду (табл. 5).

$$\Delta_{Sp}, \% = \sqrt{0,57^2 + 0,17^2 + 0,6^2 + 0,17^2 + 0,22^2 + 0,12^2 + 0,6^2 + 0,12^2} = 1,08 \%$$

Сумарна невизначеність аналізу

$$\Delta_{As}, \% = \sqrt{0,522^2 + 1,08^2 + 0,7^2} = 1,39 \% \leq \Delta_{Asteop} = 1,6 \%$$

Таким чином, повна прогнозуєма невизначеність результатів для тесту „Кількісне визначення” валацикловіру гідрохлориду не більше критичного значення $\Delta_{Asteop} = 1,6$ %, тобто методика буде давати коректні результати в інших лабораторіях.

**ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ
ПОДАЛЬШИХ РОЗВІДОК**

1. Розроблена методика кількісного визначення валацикловіру гідрохлориду в препараті «Герпевал 500» з використанням методу спектрофотометрії.

2. Проведені валідаційні дослідження з використанням критеріїв прийнятності для допусків вмісту $\pm 5,0$ %, підтверджують специфічність, лінійність, прецизійність (збіжність), правильність, діапазон застосування та внутрішньолабораторну прецизійність запропонованої методики.

**ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ
ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ**

1. Бобрицька Л.О. Забезпечення якості фармацевтичної розробки препарату «Герпевал 500» / Л.О. Бобрицька, О.С. Назарова, Ю.М. Вербова // Управління, економіка та забез-

Таблиця 3

**РЕЗУЛЬТАТИ АНАЛІЗУ МОДЕЛЬНИХ СУМІШЕЙ І ЇХ СТАТИСТИЧНА ОБРОБКА
ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ВАЛАЦІКЛОВІРУ ГІДРОХЛОРИДУ**

№ модельного розчину	Введено в % до концентрації розчину порівняння ($X_i = C_i/C_{st}$, %)	Середні значення оптичної густини (A) ($A_{st} = 0,515993$)	Знайдено в % до концентрації розчину порівняння ($Y_i = A_i/A_{st}$, %)	Знайдено в % до введеного ($Z_i = Y_i/X_i$, %)
1	79,32	0,409327	79,34	100,02
2	84,28	0,432663	83,85	99,49
3	89,24	0,459797	89,11	99,85
4	94,19	0,487866	94,55	100,38
5	99,15	0,511326	99,09	99,94
6	104,11	0,535894	103,86	99,76
7	109,07	0,563523	109,21	100,13
8	114,02	0,585916	113,55	99,56
9	118,98	0,609743	118,17	99,32
Середнє, \bar{Z} , %				99,83
Відносне стандартне відхилення, RSD_z , % $RSD_z(\%) = \sqrt{\frac{\sum (Z_i - \bar{Z})^2}{n-1}} \times \frac{100}{\bar{Z}}$				0,33
Відносний довірчий інтервал, $\Delta_z(\%) = t(95\%, n-1) \times RSD_z = 1,860 \times RSD_z$, %				0,62
Критичне значення для збіжності результатів Δ_{As} , % (гранична невизначеність)				1,6
Систематична похибка $\delta = \bar{Z} - 100 $				0,17
Критерій незначущості систематичної похибки Статистична незначущість: $\delta\% \leq \frac{\Delta_z}{3} = \frac{0,62}{3} = 0,21$ ($0,17 \leq 0,21$) якщо не виконується вимога до критерію 1), то: 2) Практична незначущість: $\delta\% \leq 0,32 \times 1,6 = 0,51$ % ($0,17 \leq 0,51$)				Виконується Виконується
Загальний висновок про точність методики				Коректна

Таблиця 4

РЕЗУЛЬТАТИ ПЕРЕВІРКИ ВНУТРІШНЬОЛАБОРАТОРНОЇ ТОЧНОСТІ

№ розчину	Величина Z_i , %		
	1 дослід	2 дослід	3 дослід
1	99,66	100,32	100,54
2	99,86	101,99	99,86
3	97,98	99,08	100,52
4	98,95	101,63	101,03
5	98,10	101,52	100,74
Середнє $\bar{Z}(\%)$, $\bar{Z}(\%) = \frac{1}{5} \sum Z_i$	98,91	100,91	100,54
Об'єднане середнє	100,12		
Відносне стандартне відхилення, $RSD_z(\%)$ $RSD_z = \sqrt{\frac{\sum (Z_i - \bar{Z})^2}{15}} \times \frac{100}{\bar{Z}}$	1,22		
Відносний довірчий інтервал, $\Delta_{\bar{z}} = t(95\%, 5) \times \frac{RSD_z}{\sqrt{5}} = 1,16 \times RSD_z$	1.7613 × 1.2 / √5 0,96 ≤ 1,6		
Критичне значення для збіжності результатів Δ_{As} , %	1,6		

**РОЗРАХУНОК НЕВИЗНАЧЕНОСТІ ПРОБОПІДГОТОВКИ ДЛЯ ТЕСТУ
«КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ» ВАЛАЦИКЛОВІРУ ГІДРОХЛОРИДУ**

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
<i>Розчин порівняння</i>		
1. зважування наважки СЗ валацикловіру гідрохлориду, 35 мг	m_0	$\Delta_m = \frac{0,2}{m_0} \times 100 \%$ 0,57
2. доведення до об'єму в мірній колбі 50 мл	50	0,17
3. відбір аліквоти пипеткою 1,0 мл	1,0	0,6
4. доведення до об'єму в мірній колбі 50 мл	50	0,17
<i>Випробовуваний розчин</i>		
5. зважування наважки препарату, 90 мг	m_1	0,22
6. доведення до об'єму в мірній колбі 100 мл	100	0,12
7. відбір аліквоти пипеткою 1,0 мл	1,0	0,6
8. доведення до об'єму в мірній колбі 50 мл	100	0,12

- печення якості в фармації. – 2011. - № 2 (16). – С. 10 - 15.
- Гризодуб А.И. Стандартизованная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта / А.И. Гризодуб, Д.А. Леонтьев, Н.В. Денисенко // Фармаком. - 2004. - № 3. - С. 3-17.
 - Гризодуб А.И. Стандартные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств / А.И. Гризодуб // Фармаком. – 2006. - № 1/2. - С. 35-44.
 - Державна фармакопея України / Державне підприємство Науково-експертний фармакопейний центр. – 1-е вид. - Харків: PIPEГ, 2001. – 556 с.
 - Державна фармакопея України Допов. 1 / Державне підприємство Науково-експертний фармакопейний центр. – 1-е вид. - Харків: PIPEГ, 2004. – 494 с.
 - Державна фармакопея України Допов. 2 / Державне підприємство Науково-експертний фармакопейний центр. – 1-е вид. - Харків: PIPEГ, 2007. – 617 с.
 - Леонтьев Д.А. К созданию государственной фармакопеи Украины. К вопросу о валидации аналитических методик / Д.А. Леонтьев // Фармаком. – 1999. - № 6. – С. 56-58.
 - Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / [Багирова В.Л., Гризодуб А.И., Чибилев Т.Х. и др.] ; под ред. Н.В. Юргеля. – М.: Фарм. пром., 2007. – 58 с.
 - Drug master file (for valaciclovir hydrochloride monohydrate) / LIVZON GROUP CHANGZHOU KONY PHARMACEUTICAL CO., LTD". – DAIXI, 2007. – P. 3.

УДК 615.07:615.281:615.453.6

Л.А. Бобрицкая, Е.С Назарова

**РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТАБЛЕТОК С ВАЛАЦИКЛОВИРОМ**

Разработана методика количественного определения валацикловира гидрохлорида в препарате «Герпевал 500» с использованием метода спектрофотометрии. Проведенные валидационные исследования, с использованием критериев приемлемости для допусков содержания $\pm 5,0 \%$, подтверждают специфичность, линейность, прецизионность (сходимость), правильность, диапазон применения и внутрилабораторную прецизионность предложенной методики.

Ключевые слова: стандартизация, противовирусный препарат, таблетки

UDC 615.07:615.281:615.453.6

L.A. Bobritskaya, E.S. Nazarova

**WORKING OUT AND VALIDATION THE METHOD OF QUANTITATIVE
DETERMINATION OF TABLETS WITH VALACICLOVIRE**

The method of quantitative determination of valaciclovire chloride of the preparation "GERPEVAL 500" by the method spectrophotometric is developed. Spent validation researches, with use of criteria of an acceptability for maintenance admissions $\pm 5,0 \%$, confirm specificity, linearity, precision (repeatability), accuracy, a range of application and intermediate precision the offered method.

Key words: pill, antiviral preparation, standardization

Адреса для листування:
61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4
Тел: (0572) 67-88-52
loridana2009@mail.ru

Надійшла до редакції:
16.01.2012