УДК 615.072:615.453.6:54.061/.062

Т. В. Зборовська, І. Ю. Капустянський, Л. В. Євсєєва, С. М. Губарь, Ю. І. Губін, О. М. Безчаснюк

Національний фармацевтичний університет

ДОСЛІДЖЕННЯ ВАЛІДАЦІЙНИХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЦИНКУ В АНТИДІАРЕЙНОМУ ЛІКАРСЬКОМУ ЗАСОБІ

Наведено валідацію аналітичної методики кількісного визначення цинку в таблетках диспергованих антидіарейної дії. Перевірені валідаційні характеристики відповідають критеріям прийнятності. Дану методику включено до методів контролю якості для аналізу лікарських форм, що містять цинк.

Ключові слова: таблетки диспергованi; методи контролю якості; солі цинку; валідація

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ

Розробка нормативно-технічної документації на лікарський препарат включає комплекс заходів, серед яких одним з основних є розробка методик якісного та кількісного аналізу лікарського засобу. Розробка методик аналітичного контролю, що відповідають критеріям прийнятності, на стадії фармацевтичної розробки лікарського препарату — вимога сучасної системи якості у фармації [1]. Проведення аналітичного контролю лікарських форм відповідно до сучасних вимог нормативної документації дозволить контролювати якість продукції на стадіях розробки, виробництва лікарського препарату та в процесі його реалізації.

АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) і Дитячий фонд ООН (ЮНІСЕФ) опублікували рекомендації щодо використання у боротьбі з гострими діарейними захворюваннями не лише лікарських препаратів регідратаційної дії, але й лікарських препаратів, які містять солі цинку [7]. Нами був розроблений лікарський препарат для лікування та профілактики діарейного синдрому в дітей у вигляді лікарської форми — таблеток диспергованих для орального застосування, що містять цинк по 20 мг (у перерахунку на цинк) [9]. При розробці методик аналізу за основу прийняті критерії якості, що встановлені у Державній фармакопеї України (ДФУ) [3] до запропонованої нами лікарської форми, а також вимоги до лікарських препаратів, які містять цинк, з рекомендацій ВООЗ та ЮНІСЕФ щодо лікування діареї у дітей [8].

ВИДІЛЕННЯ НЕ ВИРІШЕНИХ РАНІШЕ ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ

Враховуючи рекомендації ДФУ, при розробці аналітичних методик кількісного визначення діючої речовини у лікарських формах необхідно розрахувати критерії прийнятності валідаційних характеристик, розробити стандартизовану процедуру валідації аналітичних методик і провести експериментальні дослідження з вивчення метрологічних характеристик методики.

ФОРМУВАННЯ ЦІЛЕЙ СТАТТІ

Метою роботи було визначення валідаційних параметрів методики кількісного визначення цинку в лікарській формі — таблетки диспергованi та валідація цієї методики. Результатом проведення комплексу досліджень стала розробка методики контролю, необхідної для забезпечення якості таблеток диспергованих, які містять цинк, при їх розробці та впровадженні у серійне виробництво.

ВИКЛАД ОСНОВНОГО МАТЕРІАЛУ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для кількісного визначення цинку в таблетках диспергованих був обраний метод прямого комплексометричного титрування. Використання даного методу з достатньою точністю дозволило визначити кількісний вміст цинку в лікарській формі й, тим самим, підтвердити наявність необхідної дози цинку, що виявляє антидіарейний ефект.

© Т. В. Зборовська, І. Ю. Капустянський, Л. В. Євсєєва, С. М. Губарь, Ю. І. Губін, О. М. Безчаснюк, 2009

Методика

Розтирають у ступці не менше 10 таблеток. Близько 1.50 г (точна наважка) порошку розтертих таблеток поміщають у конічну колбу місткістю 500 мл, об'єм розчину доводять *водою Р* до 200 мл, додають близько 50 мг *індикаторної суміші ксиленолового оранжевого Р,* а потім *гексаметилентетрамін Р* до появи фіолетово-рожевого забарвлення розчину. Після цього додають ще 2 г *гексаметилентетраміну Р* і титрують *0.1 М розчином натрію едетату* до зміни фіолетово-рожевого забарвлення на жовте.

1 мл *0.1 М розчину натрію едетату* відповідає 6.54 мг Zn.

Згідно з ДФУ, всі аналітичні методики та випробування, що входять до методів контролю якості лікарських засобів, мають бути валідованими.

Основною метою валідації аналітичної методики є обґрунтування та експериментальний доказ того, що обрана аналітична методика буде давати відтворювані та достовірні результати. Оцінку придатності аналітичної методики кількісного визначення цинку методом прямого комплексометричного титрування з кольоровою індикацією точки еквівалентності проводили за допомогою експериментального визначення валідаційних характеристик [1]:

— *Правильність*
— *Збіжність*
— *Специфічність*
— *Лінійність*
— *Діапазон застосування*
— *Прогноз повної невизначеності методики аналізу*

Модельні розчини, вимірювання та розрахунки

Відповідно до вимог ДФУ лінійність, правильність і прецизійність визначаються на модельних розчинах. Для методики кількісного визначення ДФУ встановлює діапазон досліджуваних концентрацій, який складає від 80 % до 120 % від номінальної досліджуваної концентрації діючої речовини. Тому нами було досліджено 9 модельних розчинів 9 концентрацій з кроком 5 % від номінальної (80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 105 %, 110 %, 115 %, 120 %) [4]. За 100 % обрана концентрація діючої речовини, у перерахунку на цинк, з якої проводиться визначення цинку в методиці, що валідується — 60 мг.

При проведенні дослідження для приготування модельних розчинів використовували цинку ацетат дигідрат, який задовольняє вимогам ЕР 5 [6].

Для роботи використовували мірний посуд класу А, реактиви, що відповідають вимогам ДФУ, та ваги аналітичні Adventurer AR21402 класу точності.

Приготування модельних розчинів: точну наважку цинку ацетату дигідрату вміщують у конічну колбу місткістю 500 мл і розчиняють у 200 мл *води Р.* Додають близько 50 мг *індикаторної суміші ксиленолового оранжевого Р*, а потім *гексаметилентетрамін Р* до появи фіолетово-рожевого забарвлення розчину. Після цього додають ще 2 г *гексаметилентетраміну Р* і титрують *0.1 М розчином натрію едетату* до зміни фіолетово-рожевого забарвлення на жовте.

Для кожного з модельних розчинів проводили три титрування.

Концентрацію розчинів цинку ацетату дигідрату, в перерахунку на цинк, розраховували в нормалізованих координатах для кожного з 9-ти модельних розчинів.

Результати вивчення параметрів збіжності та правильності

Одержані результати визначення збіжності наведені в таблиці 1. Методика є точною на рівні збіжності, бо характеризується малим розкидом відносно середнього результату: знайдене значення відносного довірчого інтервалу Δz (0.23 %) є меншим за критичне значення для збіжності результатів Δ_{AS} (2.40 %).

Систематична похибка δ, що характеризує правильність методики, складає 0.44 %. Для правильності методики виконується критерій незначущості систематичної похибки ($\delta \leq \max\delta$): $\delta \leq \max\delta = 0.32 \cdot \max\Delta_{AS} = 0.32 \cdot 2.4 = 0.77$.

Отже, методика аналізу визначення характеризується достатньою збіжністю та правильністю у всьому діапазоні концентрацій (80–120 %).

Результати вивчення параметрів лінійності модельних розчинів

Лінійність — це здатність методики (в межах діапазону застосування) давати величини, що прямо пропорційні концентрації (кількості) аналізованої речовини у зразку. Розрахунок параметрів лінійної залежності $Y_i = a + b \times X_i$ проводили за допомогою методу найменших квадратів.

Розраховані величини b, a, S_b, S_a (стандартні відхилення для b і a), RSD_o (залишкове стандартне відхилення) і r (коефіцієнт кореляції) занесені до таблиці 2.

Методика відповідає критеріям лінійності, якщо коефіцієнт b (тангенс кута нахилу для розрахованої регресійної прямої) близький за своїм значенням до 1, а вільний член (коефіцієнт a регресії) статистично незначуще відрізняється від нуля.

Таблиця 1

ВИЗНАЧЕННЯ ЦИНКУ В МОДЕЛЬНИХ РОЗЧИНАХ І РОЗРАХУНОК ПАРАМЕТРІВ ЗБІЖНОСТІ ТА ПРАВИЛЬНОСТІ

Номер модельного розчину	Наважка ацетату дигідрату цинку		V титранту, мл	Вміст цинку, г	Взято Zn для експерименту у % від номінального (60 мг), X_i	Знайдено Zn у % від номінального, Y_i	$Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100$, %
	m_i, г	в перерахунку на цинк, г					
1	0.1624	0.048	7.36	0.0481	80.65	80.22	99.48
2	0.1726	0.051	7.82	0.0511	85.71	85.24	99.45
3	0.1828	0.054	8.29	0.0542	90.78	90.36	99.54
4	0.1929	0.057	8.76	0.0573	95.79	95.48	99.68
5	0.2031	0.061	9.22	0.0603	100.86	100.50	99.65
6	0.2133	0.064	9.67	0.0632	105.92	105.40	99.51
7	0.2234	0.067	10.13	0.0663	110.94	110.42	99.53
8	0.2336	0.070	10.58	0.0692	116.00	115.32	99.41
9	0.2437	0.073	11.08	0.0725	121.02	120.77	99.80
$Z_{сер.}$							99.56
Стандартне відхилення S_z							0.09
Відносне стандартне відхилення RSD, %							0.12
Відносний довірчий інтервал Δz, % $= t\,(95\,\%;\,8) \cdot RSD = 1.8595 \cdot S_z$							0.23
Критичне значення для збіжності результатів max Δ_{AS}, % ($B = \pm\,7{,}5\,\%$)							2.4
Систематична похибка δ, % $= \lvert Z_{сер.} - 100 \rvert$							0.44
Критерії невизначеності систематичної похибки							
$\delta \le \max \delta = 0.32 \cdot \max \Delta_{AS}$ $0.44 \le 0.77$							виконується
Загальний висновок про точність методики							коректна

Таблиця 2

РОЗРАХУНОК ПАРАМЕТРІВ ЛІНІЙНОЇ ЗАЛЕЖНОСТІ

№	Параметр	Значення
1	Кутовий коефіцієнт лінійної залежності b	0.99892
2	S_b	0.00349
3	Вільний член лінійної залежності a	– 0.33024
4	S_a	0.35483
5	Залишкове стандартне відхилення RSD_o	0.13640
6	Коефіцієнт кореляції методики r	0.99996

Таблиця 3

ПАРАМЕТРИ НЕВИЗНАЧЕНОСТІ МЕТОДИКИ АНАЛІЗУ

№	Джерела невизначеності	Значення	Невизначеність Δ, %	$(\Delta)^2$, %
1	Наважка вмісту таблеток для аналізу, мг Невизначеність зважування, мг	1500 0.2	$\Delta_m = 0.01$	0.0001
2	Об'єм титранту, витрачений на титрування випробовуваного розчину	~ 9 мл	$\Delta_{vt} = (0{,}02/9 \cdot 100) = 0{,}22$	0.0484
3	Невизначеність молярної концентрації титрованого розчину, приготованого згідно з ДФУ		$\sqrt{(\Delta_m)^2 + (\Delta_v)^2 + (\Delta_{vt})^2} =$ $= \sqrt{0.01^2 + 0.05^2 + 0.2^2} = 0.56$	0.2064
			Сума	0.2549
			Δ_{AS}	0.505

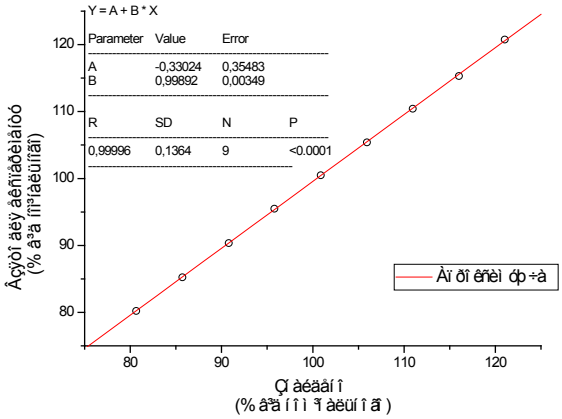

Рисунок. *Лінійна залежність, розрахована для модельних розчинів, які містять цинк, у нормалізованих координатах.*

Критерій статистичної незначущості:

$|a| \le \Delta_A = t(95\%, n-2) \cdot S_a$

За умов методики:

$0.33024 \le 1.8946 \cdot 0.3577 = 0.6778$

Отже, критерій виконується.

Вимоги до коефіцієнта кореляції виконуються (коефіцієнт кореляції методики *r* складає 0,99996, а мінімальне його значення становить 0.99571) [5].

Вимоги до залишкового стандартного відхилення RSD_o виконуються ($RSD_o = 0.1364$; $RSD_o \le max\ \Delta_{AS}/t\ (95\%;\ n\text{-}2) = 2.4/1.8946 = 1.27$).

Результати вивчення специфічності

Методика аналізу, що валідується, є *специфічною*, якщо за умов експерименту буде встановлено, що допоміжні речовини таблеток не впливають на результати титрування.

Специфічність методики для визначення цинку в таблетках диспергованих досліджувалася з використанням даних титрування контрольного досліду та впливу плацебо (V_0). Середнє значення V_0 за умов експерименту складає 0,02 мл. Вклад плацебо в сумарний об'єм титранту, взятий для титрування аліквоти, зазначеній у методиці, складає:

$\delta_0 = (0.02мл/9мл) \cdot 100 = 0.22\%$

Примітка. 9 мл — середня кількість титранту для титрування за умов методики.

Критерій незначущості впливу плацебо: $\delta_0 \le 0.32 \cdot max\ \delta = 0.25$. Критерій виконується.

Розрахунки прогнозованої невизначеності методики

Вимоги до невизначеності аналітичної методики: максимально допустима повна відносна невизначеність $max\ \Delta_{AS}$ методики аналізу кількісного визначення для дозованої лікарської форми (таблеток диспергованих) з допуском вмісту $B = \pm\ 7.5\%$ складає 2.4% [5].

Повна невизначеність аналізу (Δ_{AS}) визначається як сума невизначеності пробопідготовки і невизначеності кінцевої аналітичної операції

$$\Delta_{AS} = \sqrt{(\Delta_{sp})^2 + (\Delta_{FAO})^2}\ .$$

При використанні титриметричних методик аналізу джерелами невизначеності результату при пробопідготовці є невизначеність вимірювальних приладів (ваги) та мірного посуду. При прямому титруванні невизначеність результату кінцевої аналітичної операції пов'язана з вимірюванням об'єму титрованого розчину (бюретка) та визначенням поправкового коефіцієнту до розчину титранту.

Таким чином, прогноз невизначеності результатів прямого титриметричного визначення проводили за формулою:

$$\Delta_{AS} = \sqrt{(\Delta_m)^2 + (\Delta_{vt})^2 + (\Delta_K)^2}\ \text{, де}$$

Δ_m — невизначеність наважки випробовуваного зразка;

Δ_{vt} — невизначеність об'єму титрованого розчину бюреткою;

Δ_K — невизначеність молярної концентрації титрованого розчину.

Повна прогнозована невизначеність (Δ_{AS}) аналітичної методики визначення цинку в таблетках диспергованих по 0.02 г не перевищує гранично допустимої невизначеності результатів (2.4 %): $0.505\ \% \le \Delta_{maxAS} = 2.4\ \%$.

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ РОЗВІДОК

1. Проведено валідацію аналітичної методики комплексометричного визначення цинку в таблетках диспергованих, які містять цинк по 0.020 г, за наступними валідаційними характеристиками: правильність, збіжність, лінійність і специфічність, а також розрахована невизначеність методики аналізу. Отримані валідаційні характеристики, які відповідають критеріям прийнятності, що є встановленими та розрахованими для даних умов кількісного визначення, відповідно до ДФУ.
2. Отримані результати свідчать, що методика може бути використана для кількісного визначення цинку в таблетках диспергованих, які містять цинк по 0.020 г, і може бути включена до методів контролю якості на готову лікарську форму.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Гризодуб А. И. Стандартные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств// Фармаком — 2006. — № 1/2 — С. 35–44.
2. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности/методические рекомендации. М.: — Издательство «Спорт и Культура — 2000», 2007. — 192 с.
3. Державна фармакопея України/Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр» — 1-е вид. — Х.: РІРЕГ, 2001–556 с.
4. Державна Фармакопея України/Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр» — Доповнення 1 — Х.: РІРЕГ — 2004. — 520с.
5. Державна Фармакопея України/Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр» — Доповнення 2 — Х.: РІРЕГ. — 2008. — 608с.
6. European Pharmacopoeia — 5-th Ed/Strasbourg: Council of Europe, 2006. — 4369 p.
7. Implementing the new recommendations on the clinical management of diarrhea: guidelines for policy makers and programmer managers/World Health Organization — Geneva, 2006. — 36 p.
8. Production of Zinc Tablets and Zinc Oral Solutions, Guidelines for Programmer Managers and Pharmaceutical Manufacturers/World Health Organization — Geneva, 2007. — 28 p.
9. Губін Ю. І., Зборовська Т. В., Коваленко С. М.//Вісник фармації, — 2009. — № 4 (60). — С. 50–53.

УДК 615.072: 615.453.6: 54.061/.062

Т. В. Зборовская, И. Ю. Капустянский, Л. В. Евсеева, С. М. Губарь, Ю. И. Губин, Е. М. Безчаснюк

ИССЛЕДОВАНИЕ ВАЛИДАЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИНКА В АНТИДИАРЕЙНОМ ЛЕКАРСТВЕННОМ ПРЕПАРАТЕ

Приводится валидация аналитической методики количественного определения цинка в таблетках диспергированных антидиарейного действия. Перепроверенные валидационные характеристики соответствуют критериям приемлемости. Данная методика отнесена к методам контроля качества для анализа лекарственных форм, которые содержат цинк.

Ключевые слова: таблетки диспергированные, методы контроля качества, соли цинка, валидация.

UDC 615.072: 615.453.6: 54.061/.062

T. V. Zborovskaya, I. Y. Kapustyansky, L. V. Yevseyeva, S. N. Gubar, Y. I. Gubin, E. M. Bezchasnyuk

RESEARCH OF VALIDITY DESCRIPTIONS OF METHODS OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF ZINC IS IN ANTIDIARRHEA'S DRUG

Validation of analytical method of zinc quantitative determination in dispersed antidiarrhea tablets has been presented. Retested validation characteristics have corresponded to the criteria of acceptability. This method is included to the methods of quality control for the analysis of pharmaceutical dosage forms, contained zinc.

Key words: tablets, salts of zinc, quality control, validation.

Адреса для листування:
61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4.
Кафедра управління якістю НФаУ.
Тел: (057) 755–70–82.

Надійшла до редакції: 02.11.09