

on the results of quantitative determination of doxylamine succinate in dissolution media.

The range of the determined contents of doxylamine succinate is 18,0–36,0 µg / ml, which corresponds to the 60–120% release rate from the tablets. The technique has satisfactory specificity: the magnitude of the analytical signal of the matrix components does not exceed 2% of the analytical signal corresponding to the 60% release rate. The relative standard deviation of the results of the quantitative determination of doxylamine succinate is in the range of 0,33–1,57%. Discoverability is within 99,0–101,2%.

The test solutions are stable for at least 3 hours, after adding of 4M solution of hydrochloric acid – for at least 30 minutes. The technique was used in the study of the kinetics of dissolution of the drug Sondox, tablets, 15 mg in comparison with the original drug Donormil.

Keywords: doxylamine succinate (DS), derivative spectrophotometry, validation, dissolution test.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России: Справочник / М.: Видаль Рус. – 2016 г. – 1240 с.

2. Yehia, A. M. Development and validation of a generic high-performance liquid chromatography method for the simultaneous separation and determination of six cough ingredients: Robustness study on core-shell particles / A.M. Yehia, H.M. Essam // Journal of Separation Science. – 2016. – Vol. 39, iss. 17. – P. 3357–3367.

3. Разработка тандемной УФ-спектрофотометрической/ экстракционно-фотометрической методики количественного определения доксиламина / Л. Ю. Клименко [и др.] // Здоровоохранение Таджикистана. – 2015. – № 4. – С. 21–30.

4. Государственная фармакопея Республики Беларусь. Т. 1: Общие методы контроля качества лекарственных средств / Центр экспертиз и испытаний в здравоохран.; под общ. ред. А.В. Шерякова. – Молодечно: «Победа», 2012. – 1220 с.

5. Moffat, A. C. Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals / A. C. Moffat. – Second Edition. – London: The pharmaceutical press, 1986. – 1684 p.

6. Dibbern, H.W. UV and IR Spectra. Pharmaceutical Substances (UV and IR) and Pharmaceutical and Cosmetic Excipients (IR) [Электрон. ресурс] – Frankfurt/Main und Leofels, September 2002. – электрон. опт. диск (CD-ROM).

7. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Text on validation of analytical procedures, 1994. – 5 p.

8. Производство лекарственных средств. Валидация методик испытаний: ТКП 432-2012 (02041).

#### Адрес для корреспонденции:

210023, Республика Беларусь,  
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27,  
УО «Витебский государственный  
ордена Дружбы народов  
медицинский университет»,  
кафедра токсикологической  
и аналитической химии,  
тел. раб. 8(0212) 64-81-34,  
Жебеняев А. И.

Поступила 10.03.2017 г.

**С. Ю. Висыч, А. В. Доровской, Е. Г. Фетисова, Л. Н. Андрюкова**

### ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КИСЛОТЫ ТРАНЕКСАМОВОЙ НА ЭТАПЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ *IN VITRO*

**Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, Украина**

*В статье рассмотрены результаты валидации методики количественного определения кислоты транексамовой (КТ) методом жидкостной хроматографии при исследованиях ее рН-зависимой растворимости и кинетики высвобождения из генерического и референтного лекарственных средств на этапе исследования биоэквивалентности in vitro. Валидация проведена одновременно для обеих*

**методик количественного определения КТ на модельных растворах лекарственного средства в диапазоне от 50% до 130% от концентрации действующего вещества в испытуемом растворе в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ) по валидационным характеристикам: специфичность, правильность, прецизионность (сходимость) и линейность. Установлено соответствие методик критериям приемлемости требований ГФУ по изученным валидационным показателям для всех сред растворения с рН 1,2, рН 4,5 и рН 6,8. По результатам валидации методики количественного определения КТ обосновано и экспериментально доказано, что данные методики пригодны для количественного определения содержания действующего вещества в процессе исследований биоэквивалентности *in vitro* лекарственных средств с КТ.**

**Ключевые слова:** кислота транексамовая, валидация, биоэквивалентность, лекарственные средства.

## ВВЕДЕНИЕ

Концепция биоэквивалентности в соответствии с международной регуляторной практикой является основой для доказательства качества, эффективности и безопасности генерических лекарственных средств (ЛС). Подтверждение биоэквивалентности генерического и референтного ЛС по процедуре «Биовейвер» на основе биофармацевтической системы классификации (БСК) для упрощенной регистрации предусматривает определение растворимости действующего вещества (ДВ) с целью установления класса БСК и кинетики его высвобождения из исследуемых ЛС в трех буферных средах. Эти исследования сопровождаются количественным определением лекарственного вещества подходящим аналитическим методом. Современная нормативная документация, которая касается проведения исследований биоэквивалентности ЛС *in vitro*, требует использования валидированных аналитических методик [1, 2].

В процессе комплексных исследований биоэквивалентности по процедуре «Биовейвер» препаратов кислоты транексамовой (КТ) в твердой дозированной лекарственной форме количественное определение действующего вещества КТ проведено по разработанным методикам методом жидкостной хроматографии. Цель данной работы заключалась в изучении валидационных характеристик количественного определения КТ для экспериментального доказательства пригодности разработанных методик при исследовании биоэквивалентности *in vitro* генерического и референтного ЛС с КТ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Валидационные характеристики уста-

навливали для:

- методики исследования рН-зависимой растворимости КТ;

- методики количественного определения КТ при исследовании кинетики высвобождения ДВ из генерического («Циклокапрон-Здоровье, таблетки по 500 мг, покрытые пленочной оболочкой» опытно-промышленная серия производства ООО «ФК «Здоровье», Украина) и референтного («Циклокапрон®, 500 мг таблетки, покрытые пленочной оболочкой», производства «MEDA Manufacturing GmbH», Германия) ЛС КТ.

Все исследования проводили согласно стандартизированным процедурам, разработанным в соответствии с требованиями рекомендаций [1, 2].

При проведении исследований использовали следующее аналитическое оборудование: весы лабораторные электронные AG 204 фирмы «Mettler Toledo» (Швейцария); хроматограф жидкостный Agilent 1100 3D LC System фирмы «Agilent Technologies» (США), хроматографическая колонка Hypersil ODS, размером 250 x 4,6 мм с размером частиц 5,0 мкм; рН-метр «Seven Easy pH» в комплекте с электродами фирмы «Mettler Toledo» (Китай); мерная посуда класса А.

В работе также использовали:

- буферные растворы со значением рН 1,2; 4,5 и 6,8, которые готовили в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Украины [1] из реактивов фармакопейного качества: кислоты хлористоводородной, натрия ацетата, кислоты уксусной ледяной, калия дигидрофосфата, натрия гидроксида и натрия хлорида;

- модельные растворы КТ с «плацебо», содержащие известное количество ДВ в диапазоне от 50% до 130% от кон-

центрации в ЛС «Циклокапрон-Здоровье, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, по 500 мг» производства ООО «ФК «Здоровье», Украина;

– стандартный образец USP RS КТ, каталожный номер 1672745, номер серии RO21KO.

Хроматографирование проводили на жидкостном хроматографе с УФ-детектором в следующих оптимальных условиях: колонка – Hypersil ODS, размером 250 мм x 4,6 мм, заполненная сорбентом с размером частей 5,0 мкм; подвижная фаза: буферный раствор pH 2,5 – метанол P2 в соотношении (60:40); скорость подвижной фазы – 0,9 мл/мин; объем инъекции – 50 мкл; температура термостата колонки – 30°C; длина волны детектирования 220 нм. Условия пригодности хроматографической системы: эффективность хроматографической колонки по пику КТ – не менее 1000 теоретических тарелок; коэффициент симметрии пика КТ – от 0,8 до 1,8.

*Раствор сравнения.* Около 50,0 мг (точная навеска) стандартного образца КТ помещали в мерную колбу вместимостью 50,0 мл, растворяли в соответствующем буферном растворе, доводили объем раствора соответствующим буферным раствором до метки и тщательно перемешивали.

*Концентрированные растворы КТ.* В мерную колбу вместимостью 200,0 мл помещали около 2000,0 мг (точная навеска) КТ, добавляли 100 мл соответствующего буферного раствора, перемешивали до растворения, доводили объем раствора соответствующим буферным раствором до метки и перемешивали.

*Растворы модельных образцов.* Готовили 9 модельных растворов для каждой среды. В мерную колбу вместимостью 100,0 мл помещали около 44,0 мг смеси плацебо, добавляли аликвоту соответствующего концентрированного раствора КТ, 50 мл соответствующего буферного раствора, встряхивали в течение 10 мин, доводили объем растворов соответствующим буферным раствором до метки и тщательно перемешивали. Фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Попеременно хроматографировали растворы сравнения и модельные растворы, получая число параллельных хроматограмм не меньше, чем при проверке пригодности хроматографической системы.

Концентрации КТ  $x_i$  рассчитывали по формуле:

$$x_i = \frac{m_o \times V_i \times 50 \times P \times (100 - W)}{200 \times 100 \times m_{st} \times P_{st} \times 100} \times 100\%$$

где  $m_o$  – навеска КТ для приготовления соответствующего концентрированного раствора, мг;

$V_i$  – объем соответствующего концентрированного раствора КТ для приготовления модельных растворов, мл;

50 – объем мерной колбы при приготовлении раствора сравнения, мл;

$P$  – содержание КТ в субстанции, %;

$W$  – потеря в массе при высушивании субстанции КТ, %;

$m_{st}$  – навеска стандартного образца КТ для приготовления соответствующего раствора сравнения, мг;

$P_{st}$  – содержание КТ в стандартном образце, %.

По полученным результатам методом наименьших квадратов проводили расчет параметров линейной зависимости в системе нормализованных координат, а также значений правильности и сходимости.

Коэффициенты спектральной чистоты (purity factor, Fp) для пика КТ на хроматограммах испытуемого раствора рассчитывали с помощью программного обеспечения для жидкостных хроматографов ChemStation Rev.A.10.01, Agilent Technologies.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Валидация методик количественного определения КТ проведена для каждой среды растворения с pH 1,2, pH 4,5 и pH 6,8 в соответствии с требованиями ГФУ по основным валидационным характеристикам: специфичность, правильность, прецизионность (сходимость), линейность [1]. Учитывая одинаковые условия проведения обеих методик количественного определения КТ, проверка указанных валидационных характеристик выполнена одновременно.

Специфичность методик количественного определения является доказательством того, что методика позволяет точно и правильно установить содержимое анализируемого вещества в образце в присутствии других компонентов, например, про-

дуктов деградации, других сопутствующих примесей, вспомогательных веществ и т.д. [1]. Чтобы исключить влияние других компонентов ЛС на определение КТ, на хроматограммах модельных растворов в соответствующих буферных средах, не содержащих ДВ, должны отсутствовать пики в диапазонах  $t_R \pm w$ , где  $t_R$  – время удерживания пика КТ, рассчитанное по хроматограммам соответствующего раствора сравнения,  $w$  – ширина пика ДВ, измеренная у его основы.

Для установления специфичности получены хроматограммы соответствующих растворов плацебо, 100% модельных растворов и растворов сравнения в средах растворения с рН 1,2; 4,5 и 6,8. Примеры типичных хроматограмм испытуемого модельного раствора со 100% от концентрации КТ, раствора сравнения и раствора

«плацебо» для рН 1,2 приведены на рисунках 1–3. Подобные хроматограммы получены для сред растворения с рН 4,5 и 6,8.

При проведении исследования установлено (рисунки 1–3), что время удерживания КТ на хроматограмме испытуемого модельного раствора составляет около 9 мин и совпадает со временем удерживания соответствующего пика на хроматограмме раствора сравнения. Аналогичные результаты получены при испытаниях модельных растворов в средах растворения с рН 4,5 и 6,8. Полученные объединенные диапазоны  $t_R \pm w$  из хроматограмм растворов сравнения для каждой буферной среды растворения, а также результаты сравнения хроматограмм соответствующих растворов «плацебо» и растворов сравнения приведены в таблице 1.

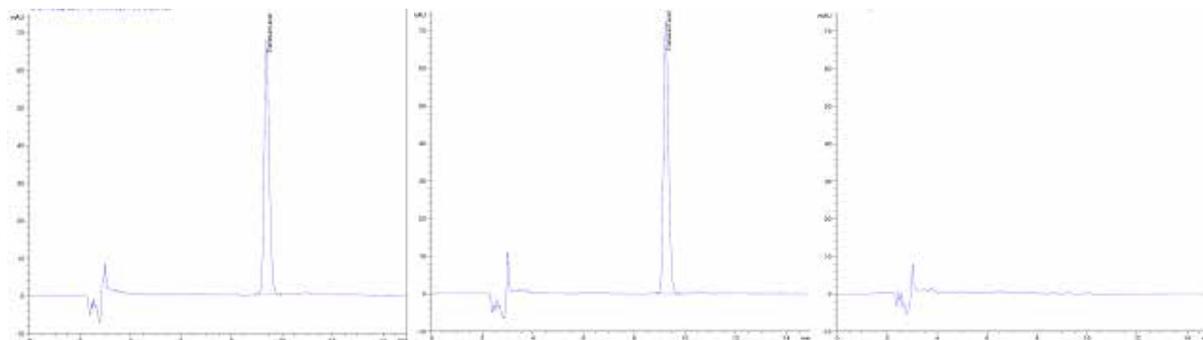


Рисунок 1 – Хроматограмма модельного раствора со 100% содержанием кислоты транексамовой для рН 1,2

Рисунок 2 – Хроматограмма раствора сравнения для рН 1,2

Рисунок 3 – Хроматограмма раствора «плацебо» для рН 1,2

Таблица 1 – Сравнение результатов хроматограмм растворов плацебо и растворов сравнения

Критерии приемлемости	Раствор сравнения		
	рН 1,2	рН 4,5	рН 6,8
Объединенный диапазон $t_R \pm w$	8,28–10,09	8,37–10,32	7,92–10,39
На хроматограммах раствора плацебо должны отсутствовать пики в диапазонах $t_R \pm w$	Раствор плацебо		
	На хроматограммах растворов плацебо отсутствуют пики в диапазонах $t_R \pm w$		

По результатам исследований на хроматограммах растворов «плацебо» ЛС отсутствуют пики со временем удерживания, совпадающие со временем удерживания пика ТК на хроматограммах испытуемых растворов и растворов сравнения во всех средах растворения.

Для подтверждения специфичности методики относительно неидентифицированных примесей проведено определе-

ние чистоты пиков аналитов на хроматограммах испытуемого раствора. Тест на спектральную чистоту свидетельствует о том, что пик на хроматограмме обусловлен поглощением отдельного вещества, а вклад посторонних источников поглощения в аналитический сигнал является незначительным. Мерой подобия спектров во всех точках пика является коэффициент спектральной чистоты (purity factor, Fp),

который в случае выполнения теста на спектральную чистоту должен быть  $F_r \geq 995,0$ . Согласно расчетам значение  $F_r$  для пика КТ на хроматограммах испытуемого раствора составляет 999,8 для всех исследуемых сред растворения с рН 1,2, рН 4,5 и рН 6,8, что свидетельствует об отсутствии влияния неидентифицированных примесей ЛС и плацебо на определение КТ и подтверждает специфичность методики.

Определение правильности, сходимости и линейности выполнено для девяти модельных образцов ЛС с «плацебо» и известным содержанием ДВ в диапазоне от 50% до 130% от концентрации КТ в испытуемом растворе. По результатам исследований методом наименьших квадратов рас-

считаны параметры линейной зависимости (свободный член  $a$ , коэффициент корреляции  $R$ ) и построены графики зависимости площадей пика КТ от концентрации КТ в нормализованных координатах. В таблице 2 приведены установленные значения валидационных характеристик, которые получены при валидации методик количественного определения КТ в процессе исследований биоэквивалентности *in vitro* ЛС с КТ. Оценка результатов валидации проводилась в соответствии с требованиями ГФУ по критериям приемлемости, которые используют при испытаниях на растворение: максимальная неопределенность результатов анализа для испытаний на растворение не должна превышать 3,0% [1].

Таблица 2 – Значения валидационных характеристик, полученных при валидации методик количественного определения кислоты транексамовой в процессе исследований биоэквивалентности *in vitro* лекарственных средств на ее основе

Испытания	Критерии приемлемости	Полученный результат		
		рН 1,2	рН 4,5	рН 6,8
Линейность	$a \leq \frac{0,32 \times \max \Delta_{As}}{1 - (X_{\min}/100)} = \frac{0,32 \times 3,0}{1 - (50/100)} = 1,92$ $Rc \geq \min Rc$ $\min Rc = \sqrt{1 - \left( \frac{\max \Delta_{As}/t}{S_y} \right)^2} = \sqrt{1 - 2,68/S_y^2}$	$a=0,26 \leq 1,92\%$ $b=0,990981$ $S^2=736,2375$ $S_o^2=0,1125$ $Rc=0,999924 \geq \min Rc=0,998178$	$a=-0,58181 \leq 1,92\%$ $b=1,006955$ $S^2=841,9482$ $S_o^2=0,0527$ $Rc=0,999969 \geq \min Rc=0,998407$	$a=1,132235 \leq 1,92\%$ $b=0,986391$ $S^2=730,6291$ $S_o^2=0,1701$ $Rc=0,999884 \geq \min Rc=0,998164$
Правильность	$\delta \leq 0,32 \times \max \Delta_{As} = 0,32 \times 3,0 = 0,96\%$	$0,61 \leq 0,96\%$	$0,02 \leq 0,96\%$	$0,01 \leq 0,96\%$
Сходимость	$\Delta_z = 1,8595 \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (z_i - \bar{z})^2}{n-1}} \leq 3,0\%$	$0,635367 \leq 3,0\%$	$0,585816 \leq 3,0\%$	$0,900347 \leq 3,0\%$
Полная прогнозируемая неопределенность результатов анализа	$\Delta_{AS, \%} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2} \leq 3,0$	Методика 1		Методика 2
		$\sqrt{1,056 + 0,8277} = 1,37 \leq 3,0\%$		$\sqrt{1,056 + 0,1889} = 1,12 \leq 3,0\%$

Зависимость площадей пика КТ от её концентрации имеет линейный и одинаковый характер для всех трех сред растворения с рН 1,2; 4,5 и 6,8. Линейность зависимости между взятым («истинным») и найденным количеством КТ во всем диапазоне исследуемых концентраций и для всех сред растворения также подтверждается выполнением требований к параметрам линейной зависимости (таблица 2).

По результатам проведенных исследований (таблица 2) методика характеризуется достаточной сходимостью и правильностью во всех трех средах растворения: значение относительных доверительных интервалов меньше критического значения для сходимости результатов; выполняется критерий незначимости системати-

ческой погрешности методики, поскольку систематическая погрешность методики  $\delta$  является практически незначимой для всех 3-х сред растворения.

Также расчетным методом проведен прогноз полной неопределенности методик ( $\Delta_{AS}$ ),

которая включает неопределенность пробоподготовки ( $\Delta_{SP}$ ) и неопределенность конечной аналитической операции ( $\Delta_{FAO}$ ) и не должна превышать максимально допустимую неопределенность результатов анализа для испытаний на растворение –  $\max \Delta_{AS} \leq 3,0\%$ . Для расчета неопределенности пробоподготовки использовали предельные погрешности весов и мерной посуды, для прогноза неопределенности конечной аналитической операции ис-

пользовали требования методов контроля качества ЛС к относительному стандартному отклонению параллельных отклонений (определений, инъекций) [1]. По результатам проведенных расчетов, которые представлены в таблице 2, требования к полной прогнозируемой неопределенности результатов для методик количественного определения КТ, использованных в исследованиях биоэквивалентности ЛС *in vitro*, выполняются со значительным запасом для обеих методик, что свидетельствует о достаточной точности измерений.

### ВЫВОДЫ

1. Проведена валидация методик количественного определения кислоты транексамовой при исследованиях ее pH-зависимой растворимости и кинетики высвобождения из генерического и референтного ЛС методом жидкостной хроматографии в соответствии с требованиями ГФУ.

2. Установлено соответствие критериям приемлемости в диапазоне от 50 % до 130 % от концентрации кислоты транексамовой в испытанном растворе для каждой среды растворения с pH 1,2; 4,5 и 6,8 для валидационных характеристик: специфичность, правильность, прецизионность и линейность.

3. Для подтверждения корректности методики при воспроизведении в других лабораториях установлено, что полная прогнозируемая неопределенность результатов анализов не превышает критическое значение неопределенности методик.

4. По результатам проведения валидации экспериментально доказано, что методики количественного определения кислоты транексамовой дают достоверные результаты, отвечают требованиям ГФУ по изученным валидационным показателям и пригодны для количественного определения содержания ДВ в процессе исследования биоэквивалентности *in vitro* ЛС с кислотой транексамовой.

### SUMMARY

S. Yu. Visych, A. V. Dorovskoy,  
E. G. Fetisova, L. N. Andryukova  
VALIDATION OF METHODS OF  
TRANEXAMIC ACID QUANTITATIVE  
DETERMINATION AT THE STAGE OF IN  
VITRO BIOEQUIVALENCE STUDY  
The results of validation of tranexamic

acid (TA) quantitative determination method are viewed in the article using the liquid chromatography method in studies of its pH-dependent solubility and release kinetics from generic and reference drugs at the stage of *in vitro* bioequivalence study. Validation was carried out simultaneously for both methods of TA quantitative determination using model solutions of the drug in the range of 50% to 130% of the active substance concentration in the test solution in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPU) according to validation characteristics: specificity, accuracy, precision (repeatability) and linearity. It has been established that the methods meet the acceptance criteria for requirements of SPU according to the studied validation parameters for all dissolution media having pH 1,2, pH 4,5 and pH 6,8. Based on the results of validation of TA quantitative determination method, it has been substantiated and experimentally proved that these methods are suitable for quantitative determination of the active substance content during *in vitro* bioequivalence studies of medicines containing tranexamic acid.

Keywords: tranexamic acid, validation, bioequivalence, medicines.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 1. – 1128 с.

2. Лікарські засоби. Дослідження біоеквівалентності: СТ-НМОЗУ 42-7.1:2016. – / ДП «Державний експертний центр МОЗ України», МОЗ України. – Введ. 2017.01.12. – К.: Міністерство охорони здоров'я України, 2016. – 79 с.

#### Адрес для корреспонденции:

61001, Украина,  
г. Харьков, площадь Защитников Украины, 17,  
Институт повышения квалификации  
специалистов фармации  
Национального фармацевтического  
университета,  
кафедра промышленной фармации и экономики,  
тел.: (057) 757-55-49,  
e-mail: protok-ipksf@nuph.edu.ua,  
Висыч С. Ю.

Поступила 23.06.2017 г.