

Рекомендована д.х.н., професором О.І.Гризодубом

УДК 615.07:54.062:543.422

ВАЛІДАЦІЯ АРГЕНТОМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ПРОКАЇНУ ГІДРОХЛОРИДУ В АПТЕЧНИХ ЛІКАРСЬКИХ ФОРМАХ

В.А.Георгіянц, Є.І.Бисага, О.А.Євтіфєєва

Національний фармацевтичний університет
Ужгородський державний університет

Наведена статистично обґрунтована процедура валідації аргентометричної методики кількісного визначення прокаїну гідрохлориду в аптечній лікарській формі (розчин прокаїну гідрохлориду 0,5%). Валідацію аналітичної методики проводили за схемою, яка зазначена в ДФУ; були розглянуті такі параметри як діапазон застосування, специфічність, лінійність, збіжність, правильність, що дозволило визначити придатність методики для вирішення поставлених завдань в умовах аптеки.

Проблема контролю якості екстемпоральних лікарських препаратів та гармонізація аналітичного забезпечення (методики контролю якості) до вимог сучасної національної системи стандартизації фармацевтичної продукції [2, 3] у відповідності з міжнародним досвідом [7-9] актуальна для України [6].

Метою нашої роботи є валідація аналітичної методики кількісного визначення пропису — розчин прокаїну гідрохлориду 0,5%. Ця лікарська форма відноситься до напівфабрикатів, які виготовляються в аптеці про запас та найбільш часто використовуються в різних індивідуальних прописах.

Враховуючи матеріально-технічне забезпечення аптек, одним з найбільш доступних і простих у виконанні в умовах аптек аналітичних методів є об'ємний аналіз лікарських форм. До того ж представляє інтерес вивчення метрологічних характеристик методик кількісного вивчення лікарських речовин у лікарських формах аптечного виготовлення для аргентометричного методу [5].

Експериментальна частина

При проведенні дослідження використовувалась субстанція прокаїну гідрохлориду фірми "Viestersfeld Siemsgluss International GmbH" Hamburg, Німеччина, серія №040220, яка задовольняє вимогам ВР 98/USP 24/ДФУ. Для роботи використовувався мірний посуд класу А, реактиви, які відповідають вимогам ДФУ, аналітичні ваги АВ

204 S/A METTLER TOLEDO, рН-метр РВ-11, фірми "Sartorius AG" (Німеччина).

Випробуваний препарат (а також і модельні розчини) був виготовлений за правилами аптечної технології в умовах аптеки та представляє собою 0,5% розчин прокаїну гідрохлориду, стабілізований 0,1 М розчином хлористоводневої кислоти — 0,4 мл на 100,0 мл лікарської форми (рН 3,8-4,5 контролюють потенціометрично ДФУ 2.2.3.)

Методика визначення К: 0,100 г натрію хлориду розчиняють у 30,0 мл води і титрують 0,1 М розчином срібла нітрату (індикатор калію хромат).

1 мл 0,1 М розчину срібла нітрату відповідає 5,844 мг NaCl.

Визначення проводили п'ять разів.

Методика визначення кислоти хлористоводневої: 5,0 мл лікарської форми титрують 0,02 М розчином натрію гідроксиду (індикатор — метиловий червоний, інтервал рН від 4,2 до 6,2) (V_1); рН розчину прокаїну гідрохлориду 0,5% без стабілізатора складає від 6,2 до 6,5.

Методика кількісного визначення прокаїну гідрохлориду: до 5,0 мл лікарської форми додають 2-3 краплі розчину бромфенолового синього (інтервал рН переходу кольору від 3,0 до 4,6) та по краплях розведenu кислоту ацетатну до отримання зеленувато-жовтого забарвлення, після чого титрують 0,02 М розчином срібла нітрату до синьо-фіолетового забарвлення (V_2).

1 мл 0,02 М розчину срібла нітрату відповідає 0,005456 г прокаїну гідрохлориду.

Випробуваний та модельні розчини готували в умовах аптеки за правилами аптечної технології, використовуючи однаково віддалений розкид концентрації прокаїну гідрохлориду (точна наважка, м, г) на всьому діапазоні застосування методики $\pm 20\%$ (відповідно 0,40 г; 0,45 г; 0,50 г; 0,55 г; 0,60 г). Кількість стабілізатора в усіх модельних розчинах однакова та відповідає пропису. Кожну лікарську форму титрували тричі (три аліквоти).

Контрольний дослід готували таким же чином, але без додавання наважки прокаїну гідрохлориду.

Таблиця 1
Визначення поправкового коефіцієнта до титру 0,1 М розчину срібла нітрату

Наважка натрію хлориду, м, г	Об'єм 0,1 М розчину срібла нітрату, Ю, мл	К
0,1001	17,00	1,0075 ₆
0,0991	16,80	1,0093 ₇
0,1004	17,00	1,0105 ₈
0,1002	17,00	1,0085 ₇
0,1015	17,20	1,0097 ₈
Середнє значення К		1,0091 ₇
Стандартне відхилення SD _к		0,0011 ₅
Відносне стандартне відхилення RSD _к , % = SD _к /K _{ср.} *100		0,11
Відносний довірчий інтервал середнього значення $\Delta st = (t(95\%,4) \cdot RSD_k) = 2,1318 \cdot RSD_k$		0,23
Відповідність вимогам ДФУ $\Delta st \leq 0,2\%$		0,23 \leq 0,2%

Статистичну обробку експериментальних даних проводили відповідно до статті ДФУ “Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту”^N [3].

Результати та їх обговорення

Відповідно до вмісту прокаїну гідрохлориду в лікарській формі і враховуючи вимоги АНД [наказ МОЗ України від 15.12.2004 р. №626] нами було обрано діапазон застосування методики від 80 до 120% (мінімальний діапазон за ДФУ [2]).

Валідацію методики кількісного визначення проводили за стандартизованою процедурою, яка детально описана в роботі [4].

Поправковий коефіцієнт до титру 0,1 М розчину срібла нітрату дорівнює K=1,0092. Відносне стандартне відхилення складає RSD_к=0,23% (n=5), що відповідає вимогам ДФУ $\Delta st \leq 0,2\%$. Необхідний титрований розчин срібла нітрату 0,02 М було одержано розведенням стандартизованого 0,1 М розчину. Для розрахунків використовували поправковий коефіцієнт K=1,0092.

Таблиця 2

Результати вивчення лінійності модельних розчинів та отримані параметри лінійної залежності

Модельний розчин, №	Введено x _i (%)	Об'єм титранту V ₂ , мл	Знайдено y _i (%), K = 1,0092	Значення	Y _i = bx _i + a
1	80,02	3,80	81,49		80,17
2	80,02	3,75	80,39		80,17
3	80,02	3,75	80,39		80,17
4	90,00	4,15	89,20		90,40
5	90,00	4,20	90,30		90,40
6	90,00	4,15	89,20		90,40
7	100,06	4,65	100,21		100,71
8	100,06	4,65	100,21		100,71
9	100,06	4,70	101,31		100,71
10	109,96	5,10	110,12		110,85
11	109,96	5,20	112,33		110,85
12	109,96	5,15	111,23		110,85
13	120,00	5,60	121,14		121,14
14	120,00	5,60	121,14		121,14
15	120,00	5,60	121,14		121,14
Кутовий коефіцієнт лінійної залежності b				1,02	
S _b				0,01	
Вільний член лінійної залежності a				-1,85	
Критичне значення для вільного члена лінійної залежності				3,25	
S _a				1,49	
Залишкове стандартне відхилення S _{res}				0,80	
Критичне значення для остаточного стандартного відхилення RSD _o				1,27	
Коефіцієнт кореляції методики r				0,9987	
Критерій лінійного коефіцієнта кореляції R _o				0,9963	

Таблиця 3

Результати аналізу модельних розчинів і їх статистична обробка

Модельний розчин, №	Наважки прокаїну г/х, г	Введено X_i факт (%) до концентрації випробуваного розчину	Об'єм титранту, мл	Знайдено y_i (%) до концентрації випробуваного розчину $K=1,0092$	Знайдено y_i (%) до введеного $Z_i=100(Y_i/X_i)$
1	0,4001	80,02	3,80	81,49	101,84
2			3,75	80,39	100,46
3			3,75	80,39	100,46
4	0,4500	90,00	4,15	89,20	99,11
5			4,20	90,30	100,34
6			4,15	89,20	99,11
7	0,5003	100,06	4,65	100,21	100,15
8			4,65	100,21	100,15
9			4,70	101,31	101,25
10	0,5498	109,96	5,10	110,12	100,15
11			5,20	112,33	102,15
12			5,15	111,23	101,15
13	0,6000	120,00	5,60	121,14	100,95
14			5,60	121,14	100,95
15			5,60	121,14	100,95
Середнє \bar{x} %					100,61
Відносне стандартне відхилення, RSD%					0,85
Відносний довірчий інтервал $\Delta_{as}\% = t(95\%, 14) \cdot RSD$					1,50
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta_{as}\%$					2,04
Систематична погрішність δ %					0,61
Критерій невизначеності систематичної погрішності 1) статистична невизначеність, 2) якщо не виконується 1), то практична невизначеність $\delta \leq 0,65$					0,17
Загальний висновок про методику					коректна

Далі було проведено теоретичний розрахунок критеріїв прийнятності метрологічних характеристик методики аналізу [3, 4]: максимально припустимої повної невизначеності — $\max \Delta_{As} = 2,24\%$, яка пов'язана з симетричними допусками вмісту $\pm 7\%$ [наказ МОЗ України від 15.12.2004 №626], максимальної систематичної похибки — $\max \delta = 0,72$, критичного значення остаточного стандартного відхилення $RSD_0\% = 1,27$, індексу кореляції — $0,9963$, критичного значення практичної невизначеності вільного члену лінійної залежності — $a = 3,58$.

У випадку неспецифічних методик аналізу (об'ємні методи) підтвердженням специфічності для вирішення поставленої задачі є доказ того, що відносна систематична похибка δ_{exc} , яка вноситься допоміжними речовинами, є незначимою в порівнянні з максимально припустимою невизначеністю аналізу $\max \Delta_{As} = 2,24\%$.

Контрольний дослід виконували з метою порівняння забарвлення досліджуваного розчину з забарвленням контрольного розчину та визначен-

ня впливу плацебо (V_0 (три аліквоти)). Середнє значення $V_0 = 0,02$ мл, що дорівнює одному діленню мірної бюретки. На титрування аліквоти $5,00$ мл лікарської форми за методикою пішло $V_{AgNO_3} = 4,65$ мл. Вклад плацебо в сумарний об'єм титранту складає

$$\delta_{exc} = \frac{100 \cdot 0,02}{4,65} = 0,43\%.$$

Критерієм незначимості впливу плацебо є виконання нерівності $\delta_{exc} \leq 0,32 \times \max \delta = 0,32 \times 0,32 \times \max \Delta_{As} = 0,033 \times B \rightarrow \delta_{exc} \leq 0,033 \times 7 = 0,23\%$. Тобто, в даному випадку вклад плацебо перевищує критерій невизначеності $0,43 \geq 0,23$ на величину $0,2\%$, що свідчить про значущість цієї похибки в порівнянні з максимально припустимою невизначеністю аналізу $\max \Delta_{As} = 2,24\%$. Врахувати дану похибку можна зменшивши максимально припустиму невизначеність: $\max \Delta_{As} = 2,24 - 0,2 = 2,04\%$, що водночас висуває більш жорсткі вимоги до результатів експерименту: $\max \Delta_{As} = 2,04\%$, $\max \delta = 0,65\%$, $RSD_0\% = 1,27$, $R_0 = 0,9963$, $a = 3,25$.

Оцінку лінійної залежності проводили на всьому діапазоні застосування методики для кожного (і) з п'яти розчинів лікарської форми і розраховували значення для кожного розчину зразка (y_i) у відсотках до номінальної концентрації прокаїну гідрохлориду за прописом. Отримані результати обробляли методом найменших квадратів для прямої $Y_i = b \cdot x_i + a$. Одержані результати — величини b , S_b , a , S_a , S_{rest} (остаточне стандартне відхилення) та r (коефіцієнт кореляції) — наведено в табл. 2.

Одержані результати свідчать, що у нашому випадку виконуються вимоги до параметрів лінійної залежності, тобто лінійність методики підтверджується на всьому діапазоні концентрацій (80-120%).

Одержані результати збіжності даної методики характеризуються малим розкиданням відносно середнього та відповідно низьким відносним стандартним відхиленням $S_{zest}(\%) = 0,8525 \leq 2,04$ на всьому діапазоні концентрацій (80-120%), що свідчить про якість роботи аналітика та якість методики, яка застосовувалась.

Систематична похибка, яка характеризує правильність методики, складає $\delta\% = 0,61$, що не перевищує критерії прийнятності ($0,61 \leq \max\delta = 0,65$) та свідчить про відсутність значущої систематичної похибки методики аналізу.

Для кількісних випробувань характеристикою якості методики є невизначеність результату аналізу [1,4]. Невизначеність — це довірчий інтервал, у межах якого з заданою ймовірністю знаходиться справжнє значення. Без оцінки невизначеності результату аналізу неможливо оцінити, наскільки

коректні отримані результати, тобто без оцінки невизначеності лабораторія не може гарантувати необхідну високу ймовірність того, що при аналізі в другій лабораторії про якість лікарського засобу буде зроблено такий же самий висновок. Рекомендації до максимально допустимої невизначеності результатів кількісного визначення введени в ДФУ [3]. Прогнозована невизначеність результатів аналізу не повинна перевищувати максимально припустиму невизначеність аналізу для допусків вмісту $\pm 7\%$ ($\max\Delta A_s = 2,04\%$). Розрахунок граничних значень довірчого інтервалу при відомому відносному стандартному відхиленні RSD для невеликих за об'ємом вибірок проводять з використанням критерію Стюдента за рівнянням: $(100 \pm \Delta x\%) = 100 \pm t(P_1, v) \cdot RSD$.

Таким чином, невизначеність аналітичної методики, валідацію якої було проведено в умовах лабораторії з контролю якості лікарських засобів, характеризується величиною $100 \pm 1,50\%$ з довірчою ймовірністю 95%, що не перевищує встановлений критерій.

ВИСНОВКИ

1. Здійснено валідацію аналітичної методики кількісного визначення розчину прокаїну гідрохлориду 0,5% за валідаційними характеристиками: специфічність, лінійність, правильність та збіжність. Отримані метрологічні характеристики методики не перевищують критерії прийнятності відповідно до ДФУ.

2. Виходячи з отриманих результатів, методика може бути використана при аналізі розчину прокаїну гідрохлориду 0,5% в аптечних закладах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Денисенко Н.В., Подпрудников Ю.В. // Фармаком. — 2004. — №3. — С. 3-17.
2. Державна фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". — 1-е вид. — Х.: РІРЕГ, 2001. — С. 556 с.
3. Державна фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". — Доп. 1. — Х.: РІРЕГ, 2004. — 520 с.
4. Евтифеева О.А., Георгиянц В.А. // Фармаком. — 2007. — №1. — С. 69-81.
5. Максютин Н.П., Каган Ф.Е., Кириченко Л.А., Митченко Ф.А. Методы анализа лекарств. — К.: Здоров'я, 1984. — 224 с.
6. Черных В.П., Тихонов А.И., Ярных Т.Г. и др. // Фармаком. — 2007. — №3. — С. 1-8.
7. British Pharmacopoeia. — 2005. — Electronic version. — 6935 p.
8. European Pharmacopoeia. — 5-th ed. — Electronic version. — 2779 p.
9. The United States Pharmacopoeia, XXX. — 2007. — Electronic version. — 3503 p.

УДК 615.07:54.062:543.422

ВАЛИДАЦИЯ АРГЕНТОМЕТРИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОКАИНА ГИДРОХЛОРИДА В АПТЕЧНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМАХ
В.А.Георгиянц, Е.И.Бисага, О.А.Евтифеева
В статье приведена статистически обоснованная процедура валидации аргентометрической методики количественного определения прокаина гидрохлорида в аптечной лекарственной форме (раствор прокаина гидрохлорида 0,5%). Валидацию аналитической методики проводили по схеме, которая указана в ГФУ; были рассмотрены следующие параметры: диапазон применения, специфичность, линейность, сходимость, правильность, что позволило определить способность методики решать поставленные перед ней задачи в условиях аптек.

UDC 615.07:54.062:543.422

VALIDATION OF THE ARGENTOMETRIC QUANTITATIVE DETERMINATION METHOD FOR PROCAINE HYDROCHLORIDE IN THE DRUGSTORE MEDICINAL FORMS
V.A.Georgiyants, Ye.I.Bisaga, O.A.Yevtifeeva
The article presents the statistically motivated procedure of validation of the argentometric quantitative determination method of procaine hydrochloride in the drugstore medicinal form (0,5% procaine hydrochloride solution). The validation of the analytical method has been performed by the scheme specified in the State Pharmacopoeia of Ukraine; the following parameters have been considered: the range of application, specificity, linearity, precision, accuracy, convergence of the results. It allowed to determine the ability of the method to solve the tasks in the conditions of drugstores.