

УДК 543.421/.424:615.11:543.544.5.068.7

С.А. Шкляєв*, Ю.В. Підпружников**

Товариство з обмеженою відповідальністю «АСТРАФАРМ»**Національний фармацевтичний університет*

ОПТИМІЗАЦІЯ АНАЛІТИЧНОЇ ПРОЦЕДУРИ ПРИ ВАЛІДАЦІЇ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЦТВА ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ, ЩО МІСТИТЬ ЕКСТРАКТ ГІНКГО БІЛОБА

Запропоновано новий підхід до оптимізації аналітичної процедури при проведенні валідації технологічного процесу, який заснований на поєднанні експресної методики кількісного визначення суми діючих речовин в кожній окремій пробі та відповідного перерахунку із застосуванням результатів кількісного аналізу об'єднаної проби, що отримані іншим методом. На підставі запропонованого підходу розроблена експресна методика кількісного визначення гінкгофлавоноглікозидів в проміжному продукті при виробництві лікарського засобу, що містить екстракт Гінкго Білоба. Досліджені валідаційні характеристики розробленої методики у відповідності до вимог Державної фармакопеї України. Запропонований підхід дозволяє значно скоротити час проведення аналізу. Розроблена комбінована методика придатна для аналітичного супроводу валідації технологічного процесу виробництва готових лікарських засобів.

Ключові слова: оптимізація аналітичної процедури, спектрофотометрія, вискоефективна рідина хроматографія, гінкгофлавоноглікозиди, валідація.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ

Згідно з вимогами GMP виробники лікарських засобів повинні проводити валідацію технологічних процесів, яка передбачає отримання документованого підтвердження того, що процес, який відбувається в межах встановлених параметрів, може здійснюватися ефективно та з відтворюваними результатами і приводить до отримання лікарського препарату, що відповідає задалегідь встановленим специфікаціям і характеристикам якості [6]. Контроль проміжних продуктів повинен здійснюватися з використанням валідованих аналітичних методик, які забезпечують отримання правильних результатів з необхідною точністю.

Оскільки в процесі валідації технологічного процесу відбувається його призупинення на час, який необхідний для проведення аналізу проміжних продуктів, питанню скорочення часу проведення аналізу приділяється велика увага. Відповідь на поставлене питання стає актуальною та визначає необхідність розробки експресних методик аналізу.

АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

Листя Гінкго описані в ДФУ, Британській та Європейській фармакопеях [2-4]. Екстракт Гінкго Білоба [5] входить до складу лікарського засобу «ГІНКГО БІЛОБА – АСТРАФАРМ, капсули по 40 мг» [1]. Основними діючими речовинами, що мають фармакологічну дію та визначаються нормативною документацією, є гінкгофлавоноглікозиди. Метод визначення вказаних речовин – вискоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ).

Методика кількісного визначення гінкгофлавоноглікозидів, яка введена до аналітичної нормативної документації [1] на готовий лікарський засіб (ГЛЗ), відповідає умовам фармакопей [5; 9-11]. Експресні методики, які б дозволяли проводити визначення сумарного вмісту активних речовин, на цей час відсутні.

ФОРМУЛЮВАННЯ ЦІЛЕЙ СТАТТІ

Метою нашої роботи була розробка та валідація експресної методики кількісного визначення екстракту Гінкго Білоба методом спектрофотометрії за вимогами ДФУ [9] з метою викорис-

© С.А. Шкляєв*, Ю.В. Підпружников, 2012

тання її для валідації технологічного процесу виробництва ГЛЗ «ГІНКГО БІЛОБА – АСТРАФАРМ, капсули по 40 мг».

ВИКЛАД ОСНОВНОГО МАТЕРІАЛУ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктом дослідження був проміжний продукт (ПП) «маса для капсулювання» у виробництві лікарського засобу: «ГІНКГО БІЛОБА – АСТРАФАРМ, капсули по 40 мг» серії 091110, який містить вказану кількість екстракту сухого Гінкго Білоба із вмістом гінкгофлавоноглікозидів не менше 8,64 мг та допоміжні речовини: лактози моногідрат і магнію стеарат. У зв'язку з певним вмістом флавоноїдів в екстракті Гінкго Білоба [10] в якості стандартного зразка використовували рутин (SIGMA P≥94 %; Pcode R5143; CAS 207671-50-9).

У ході проведення аналітичних досліджень використовували спектрофотометр «Scinco», ваги електронні Precisa XT 220A, мірний посуд класу А. Довжина хвилі вимірювання оптичної густини – 362 нм.

Методика визначення складалася з наступного: відбирали 9 проб ПП із змішувача згідно валідаційного плану, середню пробу формували, об'єднуючи частину кожної проби.

Для приготування випробуваного розчину наважку проби ПП розчиняли в 70 % етанолі, фільтрували та розводили до концентрації екстракту Гінкго Білоба 0,05 мг/мл. В якості стандартного розчину використовували розчин рутину в 70 % етанолі з концентрацією 0,02 мг/мл.

Далі вимірювали оптичну густину випробуваного розчину та розчину робочого стандартного зразка рутину, використовуючи в якості розчину порівняння 70 % етанол. Розраховували вміст діючих речовин в кожній із відібраних проб та його середнє значення за всіма пробами.

Вміст гінкгофлавоноглікозидів у об'єднаній пробі ПП визначали методом ВЕРХ [8].

Далі розраховували вміст гінкгофлавоноглікозидів X_i^{GFG} в кожній з 9 проб ПП за формулою:

$$X_i^{GFG} = \frac{X_i \times X_{HPLC}}{X_i}$$

де: X_i – вміст діючих речовин Гінкго Білоба в і-тому зразку проби, %; X_{HPLC} – вміст гінкгофлавоноглікозидів в об'єднаній пробі, який отриманий при визначенні методом ВЕРХ, %; X_i – середнє значення вмісту діючих речовин в усіх пробах, %;

Валідація аналітичної методики

Були досліджені наступні валідаційні критерії [7]: повна прогнозована невизначеність мето-

дики, специфічність, лінійність, збіжність, правильність, стабільність, внутрішньолабораторна точність. Методологія проведення валідації докладно викладена у [8, 9].

Для проведення валідації готували модельні розчини з концентрацією рутину в діапазоні 60–140 % від концентрації стандартного розчину.

Специфічність

На рис. 1 наведені спектри поглинання випробуванних розчинів та стандартного розчину рутину. На підставі отриманих спектрів можна зробити висновок, що максимум поглинання на спектрі випробуванних розчинів відповідає флавоноїдній фракції екстракту Гінкго Білоба. Валідаційні характеристики методики досліджували на стандартному розчині рутину та його модельних розчинах.

Sample Spectrum

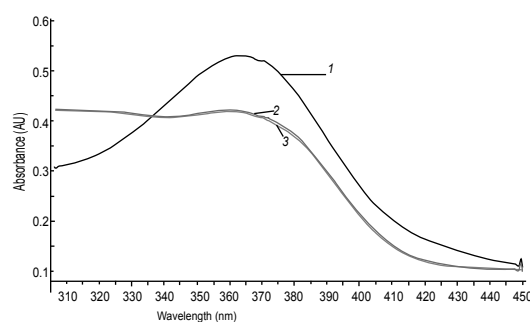


Рис. 1. Спектри поглинання стандартного розчину рутину (1) та випробуванних розчинів (2), (3).

Повна прогнозована невизначеність методики

Виходячи з методики приготування розчинів для проведення тесту «Кількісне визначення» [6] повна прогнозована невизначеність комбінованої методики із застосуванням результатів двох методів – спектрофотометричного та ВЕРХ – звичайно більша, ніж при використанні тільки метода ВЕРХ [11], але не перевищує критеріїв прийнятності та становить $1,46 < 1,6$, що відповідає вимогам $\pm 5\%$ для кількісного вмісту діючої речовини (речовин).

Правильність, збіжність

У табл. 1 наведено результати визначення валідаційних критеріїв правильність та збіжність.

З табл. 1 можна бачити виконання критеріїв правильність та збіжність відповідно до вимог ДФУ.

Лінійність

На підставі даних табл. 1 була побудована калібрувальна пряма, яка відображена на рис. 2.

Таблиця 1

РЕЗУЛЬТАТИ АНАЛІЗУ МОДЕЛЬНИХ РОЗЧИНІВ І ЇХ СТАТИСТИЧНА ОБРОБКА

№ модельного розчину	Концентрація модельного розчину, мг/мл	Концентрація в нормалізованих координатах, X_i , %	Середнє значення оптичної густини	Середнє оптичної густини в нормалізованих координатах, Y_i , %	$Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \times 100\%$
Стандартний розчин	0,02		0,5950		
1	0,012	60,00	0,3600	60,50	100,83
2	0,014	70,00	0,4171	70,10	100,14
3	0,016	80,00	0,4748	79,80	99,75
4	0,018	90,00	0,5379	90,40	100,44
5	0,02	100,00	0,5950	100,00	100,00
6	0,022	110,00	0,6536	109,85	99,86
7	0,024	120,00	0,7081	119,00	99,17
8	0,026	130,00	0,7765	130,50	100,38
9	0,028	140,00	0,8211	138,00	98,57
Середнє $Z =$			99,91		
Стандартне відхилення $SD_Z =$			0,69		
Довірчий інтервал $\Delta\% = t(95\%, f) \times SD_Z =$			1,28	< max $\Delta_{As} = 1,6$	
Перевірка незначущості систематичної похибки					
Систематична похибка $\delta[Z-100] =$			0,09	< max $\delta = 0,512$	
				< max $\Delta_{As} = 1,6$	

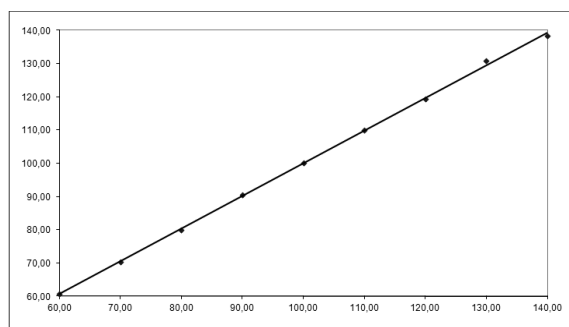


Рис. 2. Лінійна залежність оптичної густини від концентрації рутину в модельних розчинах в нормалізованих координатах.

В табл. 2 наведено визначення валідаційного критерію лінійність.

Таблиця 2

МЕТРОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЛІНІЙНОЇ ЗАЛЕЖНОСТІ

Критичний параметр	Отриманий результат	Максимальне значення
b	0,983	
S_b	0,009	
a	1,6	<1,74
S_a	0,9	
RSD_0	0,69	$\leq 0,85$
$r(x)$	0,999710	$> 0,999450$
Ліміт кількісного визначення	9,40	

З табл. 2 можна бачити відповідність критерію лінійність вимогам ДФУ.

Внутрішньолaborаторна точність

На підставі визначення гінкгофлавоноглікозидів у зразках у три різні дні різними хіміками встановлена відсутність впливу випадкових факторів при відтворюванні методики в лабораторії: отримано значення критерію прийнятності $\Delta Z_{intra} = 1,12 < \max \Delta_{As} = 1,6$.

Стабільність розчинів

Визначали протягом 2 годин. У визначений термін встановлена стабільність випробуваних та стандартних розчинів та їх придатність для проведення хроматографування: отримане значення критерію прийнятності $0,413 < \max \delta = 0,512$.

ВИСНОВКИ

1. Запропонований новий підхід до оптимізації аналітичної процедури при проведенні валідації технологічного процесу, заснований на поєднанні експресної методики визначення в кожній окремій пробі спектрофотометричним методом та перерахунку із застосуванням визначення в об'єднаній пробі методом високоефективної рідинної хроматографії. Впровадження цього підходу дозволили скоротити час проведення аналізу при валідації процесу зі 135 до 7,5 годин, тобто майже у 20 разів без значимого погіршення у повній невизначеності методики.

2. На підставі запропонованого підходу проведено розробку та валідацію експресної мето-

дики кількісного визначення гінкгофлавоноглікозидів в ПП «маса для капсулювання» при виробництві лікарського засобу «ГІНКГО БІЛОБА – АСТРАФАРМ, капсули по 40 мг» згідно вимог ДФУ.

2. Досліджені валідаційні характеристики вказаної методики та доведена придатність її для визначення гінкгофлавоноглікозидів в проміжному продукті в процесі виробництва вказаного лікарського засобу.

3. Досліджена методика придатна для аналітичного супроводу валідації технологічного процесу виробництва готових лікарських засобів.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Аналітична нормативна документація до Реєстраційного посвідчення № UA/6359/01/01 Наказ МОЗУ № 200 від 20.04.07 на ЛЗ «ГІНКГО БІЛОБА – АСТРАФАРМ, капсули по 40 мг № 10×3, 10×6 в контурній чарунковій упаковці».
2. Валідація аналітичних методик і випробувань // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х. : ПІРЕГ, 2001. – С. 58-67. – Доп. 1. – 2004. – С. 2-4.
3. Гризодуб А.И. Валідація спектрофотометричних методик кількісного аналізу лікарських засобів в соответствии с требованиями ГФУ / А.И. Гризодуб // Фармаком. – 2002. – № 3 – С. 42-50.
4. Дослідження біологічно активних речовин у сировині та фітопрепаратах на основі гінкго дволопатевого (Гінкго білоба) / О.О. Цуркан, Т.В. Ковальчук, О.В. Бурмака [та ін.] // Фармацевтичний журнал. – 2006. – № 5. – С. 86-89.
5. Листя Гінкго // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид., Доп. 2. – Х. : 2008. – С. 408-409.
6. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2011. Лікарські засоби. Належна виробнича практика.
7. Стандартизована процедура валідації методик кількісного аналізу лікарських засобів методом стандарта / А.И. Гризодуб, Д.А. Леонтьев, Н.В. Денисенко, Ю.В. Подпругников// Фармаком. – 2004. – № 3 – С. 3-17.
8. Шкляев С.А. Верифікація методики кількісного визначення гінкгофлавоноглікозидів в лікарському засобі, що містить екстракт Гінкго Білоба / С.А. Шкляев, Ю.В. Підпругников// Управління, економіка та забезпечення якості. – 2012. – № 3. – С. 4-8.
9. British Pharmacopoeia, 2008, P. 994-995.
10. European Pharmacopoeia, Monograph 1828.
11. European Pharmacopoeia, Monograph 1827.

УДК 543.421/.424:615.11:543.544.5.068.7

С.А. Шкляев, Ю.В. Подпрузжников

**ОПТИМИЗАЦИЯ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ПРОЦЕДУРЫ ПРИ ВАЛИДАЦИИ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО
СРЕДСТВА, СОДЕРЖАЩЕМ ЭКСТРАКТ ГИНКГО БИЛОБА**

Предложен новый подход к оптимизации аналитической процедуры при проведении валидации технологического процесса, основанный на применении экспрессной методики к определению суммы действующих веществ в каждой пробе и соответствующем пересчете с использованием результатов анализа объединенной пробы, полученных другим методом. На основе предложенного подхода разработана экспрессная методика количественного определения гинкгофлавоногликозидов в промежуточном продукте при производстве лекарственного средства, содержащем экстракт Гинкго Билоба. Изучены валидационные характеристики разработанной методики в соответствии с требованиями ГФУ. Предложенный подход позволил значительно уменьшить время проведения анализа. Разработанная комбинированная методика пригодна для аналитического сопровождения валидации технологического процесса производства готовых лекарственных средств.

Ключевые слова: оптимизация аналитической процедуры, спектрофотометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография, гинкгофлавоногликозиды, валидация.

UDC 543.421/.424:615.11:543.544.5.068.7

S.A. Shklyayev, U.V. Pidpruzhnikov

**OPTIMIZATION OF THE ANALYTICAL PROCEDURE DURING VALIDATION PROCESS
IN MANUFACTURE OF MEDICINES, CONTAINING EXTRACT OF GINKGO BILOBA**

A new approach to the optimization of analytical procedures during the validation process based on combining of an express method of determining in each sample and appropriate calculation using the result of assay of the combined sample, which was done by other method. On the basis of this approach, an express procedure for quantitative determination of ginkgoflavonoglikozides in the intermediate product of the manufacture of medicines containing an extract of Ginkgo Biloba was developed. The validation characteristics of the developed technique, in accordance with the requirements of the State pharmacopoeia of Ukraine were studied. This approach allows to reduce the time for assay. The procedure is approved for analytical support of validation process in the manufacture of medicines.

Key words: analytical procedure optimization, spectrophotometry, high performance liquid chromatography, ginkgoflavonoglikozides, validation

Адреса для листування:

08132, Києво-Святошинський район,

м. Вишневе, вул. Київська 6.

ТОВ «АСТРАФАРМ».

Тел./факс: (044)-239-08-99.

E-mail: mail2serg@gmail.com

Надійшла до редакції:

01.10.2012