

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЗИТРОМИЦИНА

А.Х. ВАЛИЕВ¹
В.А. ГЕОРГИЯНЦ²
А.А. ЗДОРИК²

¹Таджикский национальный университет, г. Душанбе

²Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

e-mail: vgeor@ukr.net

В статье представлены результаты валидации предложенной поляриметрической методики количественного определения азитромицина в субстанции. Валидационная оценка методики проведена по таким параметрам, как специфичность, линейность, правильность, сходимость, внутрилабораторная точность, робастность; рассчитана неопределенность анализа.

Ключевые слова: метод поляриметрии, валидация аналитических методик, азитромицин.

Введение. Препараты фармакологической группы «макролиды и азакиды» достаточно широко применяются в медицинской практике благодаря проявлению хороших клинико-экономических результатов при наиболее распространенных инфекциях и занимают одно из ведущих мест в повседневных назначениях [1]. Азитромицин выделяется среди других препаратов данной группы большой продолжительностью действия и возможностью его использования коротким 3-дневным курсом. Известно более 40 торговых названий лекарственных препаратов азитромицина, которые зарегистрированы в странах СНГ в виде различных лекарственных форм – капсулы, таблетки, порошки для приготовления суспензий и растворов для инфузий.

Разработка и валидация методик количественного определения активного вещества в субстанциях и готовых лекарственных средствах для рутинного анализа, которые не требуют значительного расхода растворителей и реактивов, продолжительного времени проведения анализа, позволяющие получать наиболее точный результат, продолжают оставаться одними из актуальных проблем фармацевтической химии.

Цель. Исходя из актуальности темы, целью работы была разработка методики количественного определения азитромицина в субстанции методом поляриметрии с перспективой использования методики для определения азитромицина в лекарственных средствах.

Материалы и методы. В работе использовали мерную посуду класса А, аналитические весы AN 204 S/A METTLER TOLEDO, полуавтоматический поляриметр АТАГО АР-300 (относительная погрешность менее $\pm 0,2\%$, точность измерения угла вращения $\pm 0,01^\circ$). Объектом исследования была субстанция азитромицина, соответствующая ФС 42-0312-07 (содержание активного вещества 96,23%) из которой готовили модельные растворы 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5%, в качестве рабочего стандартного образца использовали субстанцию азитромицина «VOEST-ALPINE INTERTRADING» (Австрия) (содержание активного вещества 97,6%).

Методика количественного определения: точную навеску субстанции азитромицина (г) помещают в мерную колбу объемом 25,0 мл, добавляют около 10 мл этилового спирта 96%, после встряхивания и растворения субстанции доводят объем раствора тем же растворителем до метки и измеряют угол вращения полученного раствора. Параллельно определяют показатель удельного вращения $[\alpha_D^{20}]$ 2% раствора рабочего стандартного образца азитромицина в 96% этиловом спирте. Испытания проводят при температуре 20°C, рассчитывают среднее пяти измерений угла вращения. Расчет содержания активного вещества азитромицина в субстанции проводят по формуле:

$$X, \% = \frac{\alpha \times 100 \times 25}{[\alpha_D^{20}] \times l \times 0.5}.$$

Результаты и обсуждение. В ходе разработки методики производили подбор



растворителя, исходя из величины угла вращения для 2% растворов и литературных данных о растворимости азитромицина в хлороформе и этиловом спирте [2]. Угол вращения растворов измеряли в одних и тех же условиях. Значения угла вращения спиртового и хлороформного растворов составили $-1,85^\circ$ и $-1,79^\circ$ соответственно. Спиртовой раствор имеет большее значение угла вращения, таким образом, использование в качестве растворителя этилового спирта позволяет уменьшить неопределенность анализа и повысить специфичность.

Показатель удельного вращения азитромицина в этиловом спирте определяли согласно фармакопейным статьям [3, 4], в результате был получен результат -48° , который соответствует пределам показателя удельного вращения (от -45° до -49°). Данное значение показателя удельного вращения использовали для расчета содержания азитромицина в растворах модельных образцов.

Перед проведением валидации разработанной методики количественного определения нами были рассчитаны критерии валидационных характеристик методики с учетом допусков содержания ($V \pm 2\%$) и проведен прогноз общей неопределенности анализа. Неопределенность анализа оценивали по величинам неопределенности пробоподготовки (Δ_{SP}) модельного раствора и раствора рабочего стандартного образца и неопределенности конечной аналитической операции Δ_{FAO} – относительной погрешности прибора для двух измерений стандартного и модельного образцов [4, 5, 6]. Неопределенность анализа составила 0,43%, что не превышает критерий максимально допустимой систематической погрешности 0,64%.

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 - \Delta_{FAO}^2} = \sqrt{0.04^2 + 0.23^2 + 0.04^2 + 0.23^2 + 0.2^2 + 0.2^2} \approx 0.43\%$$

Руководствуясь принципом параллельного определения валидационных характеристик, сходимость, правильность и линейность методики оценивали одновременно для девяти модельных образцов азитромицина в интервале концентраций 0,5-4,5%. Концентрации модельных образцов и результаты анализа рассчитывали в «нормализованных» координатах [6], что позволило наглядно представить результаты эксперимента и сопоставить их с валидационными критериями. Сходимость и правильность методики определяли по рассчитанным значениям среднего, стандартного отклонения, интервала неопределенности и систематической погрешности, которые приведены в табл. 1.

Таблица 1

Оценка сходимости и правильности

№	Раствор, %	Введено X_i , %	α , °	Найдено Y_i , %	Z_i , %
1	0,5	20,00	-0,46	19,97	99,83
2	1,0	40,00	-0,92	39,93	99,83
3	1,5	60,00	-1,38	59,90	99,83
4	2,0	80,00	-1,85	80,30	100,37
5	2,5	100,00	-2,31	100,26	100,26
6	3,0	120,00	-2,77	120,23	100,19
7	3,5	140,00	-3,21	139,32	99,52
8	4,0	160,00	-3,68	159,72	99,83
9	4,5	180,00	-4,16	180,56	100,31
$Z_{ср.дн.}$, %					99,99
S_z , %					0,29
Δ_z , %					0,55
критическое значение Δ_{As} , %					2,00
δ , %					0,01
критерий $\max \delta$, %					0,64

Оценка линейности методики заключалась в определении интервала концентраций, в котором показатель удельного вращения являлся бы постоянной величиной, а также в оценке величин коэффициента корреляции r , остаточного стандартного от-

клонения RSD_0 и коэффициентов линейности. В результате анализа модельных образцов были получены следующие результаты: $b=1,00$, $S_b=0,0023$, $a=-0,02$, $S_a=0,26$, $RSD_0=0,36$, $r=1,00$, график линейности $Y_i=1,00 \cdot X_i - 0,02$. По результатам статистической обработки данных методом наименьших квадратов было установлено, что методика линейна во всем диапазоне концентраций (рис. 1).

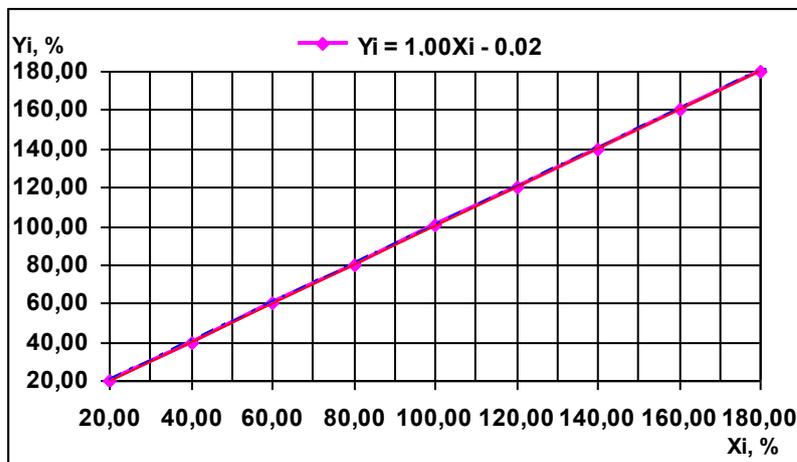


Рис. 1. График линейной зависимости величины угла вращения от концентрации

При разработке методики нами были исследованы факторы, которые влияют на результаты анализа, таким образом, проводилась оценка робастности методики. Для определения стабильности угла вращения во времени измеряли угол вращения 2% модельного раствора ($\alpha_{2\% \text{ р-ра}}$) и раствора стандартного образца в течение 1 часа. Результаты испытаний представлены в табл. 2.

Таблица 2

Оценка стабильности растворов во времени

t, мин	0	15	30	45	60	Среднее	RSDt%	Δ_t , %	max δ , %
$\alpha_{2\% \text{ р-ра}}$	-1,85°	-1,85°	-1,83°	-1,82°	-1,80°	-1,83°	1,16	2,47	0,64
$\alpha_{\text{р-раPCO}}$	-1,92	-1,92	-1,91	-1,91	-1,89	-1,91	0,64	1,37	

Как видно, $\Delta_t \geq \text{max}\delta = 0,64\%$, т. е. испытуемый раствор неустойчив в течение 1 часа, устойчивость угла вращения наблюдается лишь в первые 15 минут.

Исследования внутрилабораторной прецизионности проводили на 5 пробах 2% раствора исследуемой субстанции азитромицина. Анализ проводился для каждой пробы в разные дни, разными аналитиками, с использованием разной мерной посуды. Проводили статистическую обработку полученных данных Z_i %, рассчитывали единое стандартное отклонение SD_z и относительный доверительный интервал Δ_{intra} , результаты приведены в табл. 3.

Таблица 3

**Результаты проверки
внутрилабораторной прецизионности**

№ пробы	1 день	2 день	3 день
1	100,00	99,88	99,07
2	99,65	98,64	98,88
3	98,68	96,85	97,99
4	98,78	98,49	98,73
5	99,87	99,56	99,49
$Z_{\text{средн.}}$, %	99,39	98,68	98,83
$Z_{\text{объед.средн.}}$, %	98,97		
S_z , %	0,62	1,18	0,55
SD_z , %	0,83		
Δ_{intra} , % (k = 5)	0,66		



Выводы. Разработана и валидирована методика количественного определения субстанции азитромицина методом поляриметрии. По результатам внутрилабораторного эксперимента было установлено, что метрологические характеристики таких валидационных параметров методики, как правильность, сходимость, линейность и внутрилабораторная прецизионность, не превышают валидационные критерии. Стабильность угла вращения испытуемых образцов наблюдается в течение первых 15 минут. Методика может быть воспроизведена в условиях лаборатории, при доверительной вероятности 95% отклонение единичного значения составляет $98,97 \pm 0,66\%$.

Литература

1. Веселов, А.В. Азитромицин: современные аспекты клинического применения / А.В. Веселов, Р.С. Козлов // Клин. микробиология и антимикроб. химиотерапия. – 2006. – Т. 8, № 1. – С. 18-32.
2. Clarke`s analysis of drugs and Poisons / Edited by A. C. Moffat, M. D. Osselton and B. Widdop. – London : Pharmaceutical-Press, 2004. – 1632 p.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации. – М. : «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2008. – 704 с.
4. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків : РІПЕГ, 2001. – 556 с.; Доповнення 1. – Харків : РІПЕГ. – 2004. – 520 с.; Доповнення 2. – Харків : РІПЕГ. – 2008. – 608 с.
5. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности : метод. рекомендации. – М. : Спорт и Культура. – 2000», 2007. – 192 с.
6. Стандартизована процедура валідації методик кількісного аналізу лікарських засобів методом стандарту / О.І. Гризодуб, Д.А. Леонтєв, Н.В. Денисенко, Ю.В. Підпружников // Фармаком. – 2004. – № 3. – С. 3-17.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF AZITHROMYCIN

A.H. VALIEV¹
V.A. GEORGIYANTS²
A.A. ZDORYK²

¹ *Tajik National University,
Dushanbe*

² *National University of Pharmacy,
Kharkov*

e-mail: vgeor@ukr.net

The results of the validation of proposed polarimetric quantitative determination method of azithromycin in the substance are presented in the article. The validation procedure for evaluation of the parameters such as specificity, linearity, accuracy, repeatability, intra-laboratory precision, robustness was performed; uncertainty of analysis was calculated.

Key words: polarimetry method, validation of analytical methods, azithromycin.