

УДК: 615.014.24:54.062

В. К. ЯКОВЕНКО, В. А. ГЕОРГІЯНЦ

Національний фармацевтичний університет

ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ НАТРІЮ ПІКОСУЛЬФАТУ У СКЛАДНИХ КРАПЛЯХ «ПІКОСЕН»

Проведена валідація методики кількісного визначення натрію пікосульфату методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) у краплях оральних «Пікосен». Встановлено, що методика відповідає вимогам Державної Фармакопеї України за основними валідаційними характеристиками: специфічність, правильність, лінійність, робастність. Результати досліджень використані при розробці методів контролю якості крапель оральних «Пікосен».

Ключові слова: кількісний аналіз, валідація, хроматографія, валідаційні характеристики, натрію пікосульфат.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ

Одним з важливих етапів створення методів контролю якості на оригінальний препарат є розробка методик якісного та кількісного визначення діючих речовин у ньому. Високі вимоги до ефективності, якості та безпечності лікарських препаратів обумовлюють необхідність розробки нових та удосконалення існуючих методів аналізу. Для багатокомпонентних препаратів, що містять відомі активні фармацевтичні інгредієнти, в першу чергу, використовують фармакопейні методи аналізу субстанцій. Також завданням розробника є пошук методів та методик, які дозволять одночасно проаналізувати декілька речовин і переваги тут мають інструментальні методи, які є більш чутливими, специфічними та точними [1, 6]. Методики аналізу, нові та змінені, обов'язково необхідно валідувати, цього потребує як Державна фармакопея України, так і національний стандарт з належної виробничої практики [4, 5].

ФОРМУЛЮВАННЯ ЦІЛЕЙ СТАТТІ

Метою нашої роботи була адаптація методики визначення натрію пікосульфату у проносному засобі – краплях оральних «Пікосен» – та її валідація.

ВИКЛАД ОСНОВНОГО МАТЕРІАЛУ ДОСЛІДЖЕННЯ

1 мл розробленого нами препарату «Пікосен» містить таку комбінацію діючих речовин: на-

трію пікосульфату – 7,5 мг, сени листя екстракту сухого – 10 мг. Як допоміжні речовини до складу входять сорбіт, натрію метилпарагідроксibenзоат, ароматизатор «Альпійські трави» та вода очищена. Лікарський засіб «Пікосен» у вигляді оральних крапель рекомендується до застосування як проносний засіб [2].

Об'єктами нашого дослідження стали оральні краплі «Пікосен» та натрію пікосульфат.

Визначення натрію пікосульфату проводили методом рідинної хроматографії за методикою наведеною в ДФУ (2.2.29^н) [4].

Випробовуваний розчин: 1 мл препарату поміщали в мірну колбу місткістю 100 мл, додавали близько 50 мл води Р, перемішували і доводили водою Р до мітки, фільтрували крізь мембранний фільтр з діаметром пор 0,45 мкм.

По 10 мкл випробовуваного розчину і розчину РСЗ натрію пікосульфату поперемінно хроматографували на рідинному хроматографі з УФ-детектором, отримуючи не менше 5 хроматограм для кожного розчину в таких умовах:

- колонка розміром 15 см × 4,6 мм заповнена силікагелем октадецилсилільним Р для хроматографії з розміром частинок 5 мкм або аналогічна, для якої виконуються умови тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи»;
- рухома фаза – 0,067 М фосфатний буферний розчин рН 7,0 Р (фаза А) : ацетонітрил Р (фаза В);
- швидкість рухомої фази – 1 мл/хв; детектування при довжині хвилі – 263 нм; температура колонки – 30 °С (табл. 1).

Таблиця 1

ГРАДІЄНТИ РУХОМИХ ФАЗ ПРИ
ПРОВЕДЕННІ ХРОМАТОГРАФУВАННЯ

Час, хв	Рухома фаза А, % об/об	Рухома фаза В, % об/об
0-10	75	25
10-15	75→40	25→60
15-25	40	60
25-26	40→75	60→25
26-40	75	25

ВЕРХ-хроматограми, одержані при кількісному визначенні натрію пікосульфату в препараті «Пікосен», наведені на рис. 1 і 2.

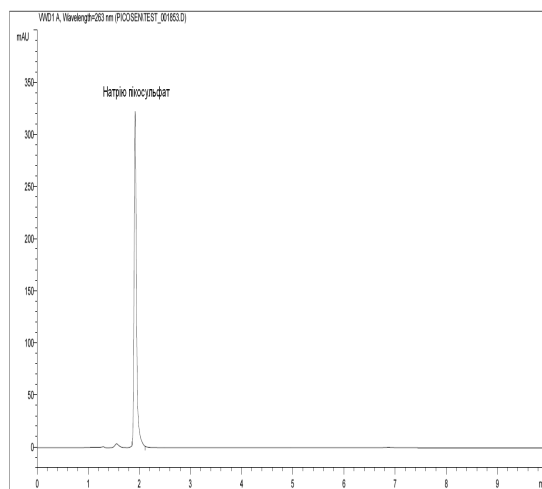


Рис. 1. Хроматограма стандартного розчину

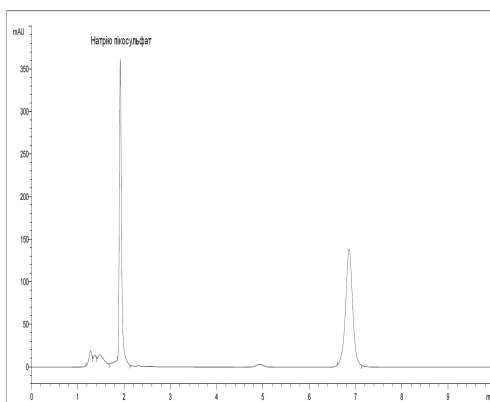


Рис. 2. Хроматограма досліджуваного розчину

Вміст натрію пікосульфату (X_1) в 1 мл препарату, в міліграмах, обчислювали за формулою:

$$X_1 = \frac{S_1 \times m_0 \times 5 \times P \times 100 \times 1000}{S_0 \times 100 \times 25 \times 100 \times 1} = \frac{S_1 \times m_0 \times P \times 2}{S_0}$$

де S_1 – середнє значення площі піку натрію пікосульфату із хроматограм випробовуваного розчину;

S_0 – середнє значення площі піку натрію пікосульфату із хроматограм розчину робочого стандартного зразка (РСЗ) натрію пікосульфату;

m_0 – маса наважки РСЗ натрію пікосульфату, г;

P – вміст натрію пікосульфату в РСЗ натрію пікосульфату, %.

Результати аналізу вважаються вірогідними, якщо виконуються вимоги тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи». Хроматографічна система вважається придатною, якщо виконуються такі умови:

- ефективність хроматографічної колонки, розрахована за піком натрію пікосульфату із хроматограми розчину РСЗ натрію пікосульфату, має бути не менше 1500 теоретичних тарілок;
- відносне стандартне відхилення площі піку натрію пікосульфату, розраховане із хроматограм розчину РСЗ натрію пікосульфату, має бути не більше 2,0 %;
- коефіцієнт розділення піків, розрахований за піком натрію пікосульфату на хроматограмах розчину РСЗ натрію пікосульфату, має бути від 0,8 до 2,0.

Отримані нами результати визначення кількісного вмісту натрію пікосульфату у препараті за наведеною методикою свідчать про її відтворюваність.

Відповідно до вимог Державної фармакопеї України, методики кількісного визначення лікарських засобів, що включені в аналітичну нормативну документацію, мають бути валідовані. Набір досліджуваних валідаційних характеристик залежить від призначення аналітичної методики [3, 7, 9]. Валідація методики кількісного визначення натрію пікосульфату в краплях оральних «Пікосен» проводилася за окремими типовими характеристиками: специфічність, правильність, лінійність, робастність.

Прогноз невизначеності пробопідготовки.

Повна відносна похибка (Δ_{As}) визначення кількісного вмісту вираховувалася за співвідношеннями:

$$\Delta_{As} \leq 0,32 \cdot B \text{ та } \Delta_{As}^2 = 2(\Delta_m^2 + \Delta_v^2),$$

де Δ_{As} – відносна невизначеність результатів кількісного випробування;

Δ_m – відносна невизначеність зважування;

Δ_v – відносна невизначеність мірного посуду;

B – межі вмісту діючої речовини (для даної методики 10 %).

Прогноз невизначеності пробопідготовки розраховували на основі загальних вимог ДФУ до лабораторного обладнання (табл. 2). У досліджах нами використовувалися електронні аналітичні ваги 2 класу точності та мірний посуд 1 класу точності.

Таблиця 2

ОЦІНКА НЕВИЗНАЧЕНОСТІ
ПРОБОПІДГОТОВКИ

Обладнання, використане у процесі пробопідготовки	Невизначеність
Аналітичні ваги	0,2 мг
Мірна колба на 25 мл	0,23 %
Мірна колба на 100 мл	0,12 %
Мірна піпетка на 1 мл	0,6 %
Мірна піпетка на 5 мл	0,6 %

Розрахована невизначеність приготування досліджуваного розчину склала 0,61 %, приготування розчину порівняння – 0,82 %. Невизначеність пробопідготовки кількісного визначення натрію пікосульфату в лікарському засобі «Пікосен» становить 1,02 %, максимально допустиме відхилення площ піків на хроматограмах – не більше 2 % (відповідно до вимог ДФУ). Отже розрахована невизначеність пробопідготовки й аналізу в цілому мають забезпечити достатню точність вимірювань.

Специфічність методики доводили шляхом порівняння хроматограм стандартного, досліджуваного та холостого розчинів. Час утримання натрію пікосульфату на хроматограмі досліджуваного розчину відповідає часу утримання відповідних піків з хроматограми розчину порівняння. На хроматограмі холостого розчину не виявлено піків, вищих за шум базової лінії, час утримання яких збігався б з часом утримання аналізованих речовин.

Розчини для хроматографування готували за аналітичною методикою. Холостий розчин готу-

вали аналогічно досліджуваному розчину препарату.

Для перевірки **правильності та прецизійності методики** готували 3 окремі суміші з точно відомим вмістом субстанції, які охоплювали діапазон застосування методики (з концентраціями 80, 100, 120 від номінальної). Для кожної модельної суміші було проведено 3 паралельні аналізи. Відповідно до ДФУ розраховували такі критерії: систематична похибка $\delta\%$ (для правильності) і відносний довірчий інтервал Δ_z (для прецизійності):

$$s_z(\%) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Z_i - \bar{Z})^2}{n-1}}, \quad (1)$$

$$\Delta_z = s_z(\%) \cdot t(95\%, n-1) \leq \Delta_{As}, \quad (2)$$

$$\delta\% = \left| \bar{Z} - 100 \right| \leq \frac{\Delta_z}{\sqrt{n}}, \quad (3)$$

де s_z – відносне стандартне відхилення, % (розраховане для відношень «знайдено/введено»);

n – обсяг вибірки;

Δ_z – відносний довірчий інтервал;

Δ_{As} – критичне значення для збіжності результатів;

t – односторонній критерій Стюдента для імовірності 95 % і числа ступенів свободи $v = n - 1$;

$\delta\%$ – систематична похибка;

Z – знайдений вміст, у % до введеного;

\bar{Z} – середнє значення Z .

Результати дослідів та проведених розрахунків наведені в табл. 3.

Таблиця 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРАВИЛЬНОСТІ ТА ПРЕЦИЗІЙНОСТІ
МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ НАТРІЮ ПІКОСУЛЬФАТУ

Вміст у модельній суміші, у % до номінального	Площа піку натрію пікосульфату	Знайдено вміст до номінального, %	Знайдено вміст до введеного, %
80	828,54	79,95	99,94
	841,70	81,22	101,52
	830,12	80,10	100,13
100	1028,08	99,20	99,20
	1045,15	100,85	100,85
	1050,87	101,40	101,40
120	1246,26	120,26	100,21
	1237,99	119,46	99,55
	1247,43	120,37	100,31
Середнє значення Z			100,35
Відносне стандартне відхилення S_z %			0,785
Відносний довірчий інтервал Δ_z			1,46
Критичне значення для збіжності результатів Δ_{As}			< 3,2
Систематична похибка $\delta\%$			0,346
Критерій невизначеності систематичної похибки			< 0,487

Експериментальні результати прецизійності характеризуються припустимим розкиданням відносно середнього і, відповідно низьким стандартним відхиленням $S_z \%$ ($S_z \% = 0,785 < 3,2$) на всьому діапазоні концентрацій (80-120%), що свідчить про якість роботи аналітика та методики, що застосовувалась. Систематична похибка методики становить $\delta\% = 0,346$, що характеризує достатню близькість середнього результату отриманої оптичної густини до його номінального значення.

Для підтвердження лінійності аналітичної методики використовуються такі параметри: коефіцієнт регресії, кут нахилу лінії регресії і залишкова сума площ. Для дослідження лінійності ми готували 9 розчинів стандартних зразків натрію пікосульфату з відомою концентрацією в діапазоні концентрацій 80 – 120 % від номінального вмісту в препараті. Розчини різних концентрацій готували шляхом розведення одного розчину ваговим способом. Тому, можлива систематична похибка при пробопідготовці значно менше впливає на коефіцієнт b і коефіцієнт кореляції.

Для приготування модельних розчинів натрію пікосульфату точну наважку РСЗ натрію пікосульфату поміщали в мірну колбу та розчиняли у воді P , доводили об'єм розчину до 100 мл та перемішували. Одержаний розчин у відповідних об'ємах переносили в окремі колби місткістю по 5 мл та зважували: 80 % – 0,8000 мл; 85 % – 0,8500 мл; 90 % – 0,9000 мл; 95 % – 0,9500 мл; 100 % – 1,0000 мл; 105 % – 1,0500 мл; 110 % – 1,1000 мл; 115 % – 1,1500 мл; 120 % – 1,2000 мл.

Кожну колбу доводили до мітки водою P і зважували. Концентрацію розраховували в мкг/г діючої речовини на 1 г розчинника. Хроматографування виконували за умов, описаних у методиці. Розрахунки проводили в нормалізованих координатах. Отримані результати (табл. 4) аналізували методом лінійної регресії. Результати розрахунків наведені в табл. 5.

Таблиця 4

РЕЗУЛЬТАТИ ВИВЧЕННЯ ЛІНІЙНОСТІ МОДЕЛЬНИХ РОЗЧИНІВ НАТРІЮ ПІКОСУЛЬФАТУ			
Концентрація, мкг/г	Площа піку	Концентрація, % від номінальної	Площа піку, % від номінальної
16,16	830,71	80,16	80,03
17,15	889,63	85,09	85,71
18,23	944,22	90,41	90,97
18,94	981,28	93,94	94,54
20,16	1037,95	100,00	100,00
21,10	1089,95	104,68	105,01
22,14	1143,82	109,82	110,20
23,28	1194,89	115,43	115,12
24,16	1249,18	119,81	120,35

Таблиця 5

ОЦІНКА ПОКАЗНИКІВ ЛІНІЙНОСТІ
МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ

Назва параметра	Результат	Критерій
Кутовий коефіцієнт лінійної залежності, b	0,99714	–
Вільний член лінійної залежності, a	0,57	$< 5,1$
Коефіцієнт кореляції, r	0,99936	$> 0,99236$

Графік та рівняння лінійної регресії наведені на рис. 3.

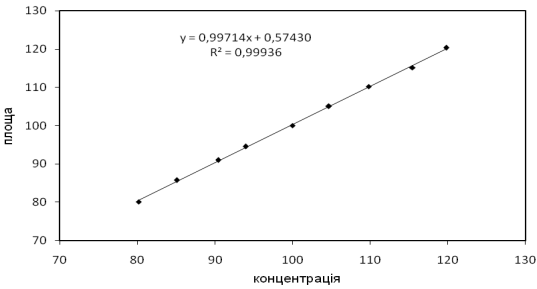


Рис. 3. Графік залежності площі піків від концентрації натрію пікосульфату

Вимоги до параметрів лінійної залежності в нашому випадку виконуються в усьому діапазоні застосування методики (80-120%).

Робастність – стійкість методики до невеликих змін умов експерименту перевіряли на досліджуваному розчині. Умови хроматографування змінювались у межах $\pm 10 \%$ від вказаних у методиці, при цьому розглядали такі параметри хроматограми, як коефіцієнт асиметрії піків і число теоретичних тарілок. Результати досліджень наведені в табл. 6.

Таблиця 6

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ
РОБАСТНОСТІ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО
ВИЗНАЧЕННЯ НАТРІЮ ПІКОСУЛЬФАТУ
В ПРЕПАРАТІ «ПІКОСЕН»

Умови проведення аналізу	Параметри		
	Час утримання, хв	Число теоретичних тарілок	Коефіцієнт асиметрії
Стандартні умови методу	1,927	9819	0,85
Швидкість потоку 1,1 мл/хв, (-10 %)	1,761	8456	0,81
Швидкість потоку 0,9 мл/хв, (+ 10 %)	2,155	11171	0,86
Температура колонки 33 °C	1,931	9715	0,84
Температура колонки 27 °C	1,937	9322	0,87
+ 10 % фосфатного буферу	3,873	6000	0,85
+ 10 % ацетонітрилу	1,905	8299	0,80

Найбільше на результати впливають зміни у швидкості потоку рухомої фази та збільшення масової частки буферного розчину в її складі. Коефіцієнт асиметрії при відхиленнях в умовах хроматографування залишається практично незмінним.

Як видно з даних табл. 7, відхилення від вихідної концентрації лежить в межах інструментальної похибки. Отже, досліджуваний розчин придатний для аналізу протягом доби.

Таблиця 7

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ АНАЛІЗОВАНИХ РОЗЧИНІВ

Час зберігання, год	Концентрація досліджуваного розчину		Концентрація розчину порівняння	
	Зміна, %	Різниця, % від початкової	Зміна, %	Різниця, % від початкової
0	100	–	100	–
1	100	0	99,99	0,01
4	100,12	0,12	99,76	0,24
12	100,24	0,24	100,02	0,02
24	100,58	0,58	99,99	0,01
RSD, %	0,11	–	0,12	–

Стабільність розчину вивчали, порівнюючи концентрації досліджуваного розчину з використанням одного і того самого стандартного розчину протягом 1 доби (табл. 7).

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ РОЗВІДОК

- Опрацьована методика кількісного визначення натрію пікосульфату в розробленому препараті – краплях оральних «Пікосен».
- Проведено валідацію методики кількісного визначення натрію пікосульфату відповідно до вимог ДФУ. Встановлено, що методика відповідає вимогам ДФУ за специфічністю, правильністю, прецизійністю та робастністю в діапазоні 80-120 % від номінального вмісту.
- Отримані результати використані при розробці методів контролю якості на краплі оральні «Пікосен».

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

- Арзамасцев А.П. Валидация аналитических методов / А.П. Арзамасцев, Н.П. Садчикова, Ю.Я. Харитонов // Фармация. – 2006. – № 4. – С. 8–13.
- Вишневський І.А. Вивчення специфічної активності нового проносного лікарського засобу у вигляді пероральних крапель / І.А. Вишневський, В.К. Яковенко, В.А. Георгіянц // Збірник наукових праць співробітників НМАПО – Вип.18. – Книга 3 – К., 2009. – С. 537-539.
- Гризодуб А.И. Стандартные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств / А.И. Гризодуб // – Фармаком. – 2006. – № 1-2. – С. 35-44.
- Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Доповнення 2 – Х. : Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – 620 с.
- Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2011 Лікарські засоби. Належна виробнича практика / М. Ляпунов, О. Безугла, О. Соловйов та ін. – К. : МОЗ України, 2010. – 169 с.
- Береговых В.В. Валидация в производстве лекарственных средств / В.В. Береговых, Н.В. Пятигорская, В.В. Беляев и др. – М. : Издательский дом «Русский врач», 2010. – 286 с.
- Руководство ICH «Валидация аналитических методик. Содержание и методология Q2 (R1) / Междунар. конф. по гармонизации технических требований к регистрации медицинских лекарственных средств. Гармонизированное трехстороннее руководство ICH // ФАРМАЦИЯ. – 2008. – № 4. – С. 3-10.
- Bliesner D.M. Validating Hromatographic Methods. A Practical Guide. – Wiley-Interscience, 2006. – 291 p.
- Ermer J. and J.H. Miller. Method Validation in Pharmaceutical Analysis. – Wiley-VCH, 2005. – 403 p.
- European Pharmacopoeia. – 4 th ed. – Strasbourg : Council of Europe, 2001. – 2416 p.

УДК : 615.014.24:54.062

В. К. Яковенко

**АДАПТАЦИЯ И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
НАТРИЯ ПИКОСУЛЬФАТА В СЛОЖНЫХ КАПЛЯХ «ПИКОСЕН»**

Проведена валидация методики количественного определения натрия пикосульфата методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в каплях оральных «Пикосен». Установлено, что методика отвечает требованиям Государственной Фармакопеи Украины по основным валидационным характеристикам: специфичность, правильность, линейность, робастность. Результаты исследований использованы при разработке методов контроля качества капель оральных «Пикосен».

Ключевые слова: количественный анализ, валидация, хроматография, валидационные характеристики, натрия пикосульфат.

УДК : 615.014.24:54.062

V. K. Yakovenko

**ADAPTATION AND VALIDATION OF TECHNIQUE OF QUANTITATION
OF SODIUM PICOSULPHATE FOR COMPOUND DROPS «PICOTEN»**

The validation process of the method of quantitative determination of natrii picosulfas by the method of high performance gas liquid chromatography in the oral drops «Pikosen» are shown. The basic validation parameters such as: specificity, accuracy, linearity, robustness were determined. It was determined, that method is quite sensitive.

Key words: quantitative analysis, validation, chromatography, validation parameters, natrii picosulfas.

Адреса для листування:

61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

Кафедра ПФЕ НФаУ

E-mail: mail@ukrfa.kharkov.ua

Надійшла до редакції:

29.08.2012