

УДК 615.07:615.281/.282:615.453.6

Л.О. БОБРИЦЬКА, О.С. НАЗАРОВА*, Ю.М. ВЕРБОВА*

Національний фармацевтичний університет

* Державне підприємство «Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції»

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ТАБЛЕТОК З ОРНІДАЗОЛОМ

Розроблена методика кількісного визначення орнідазолу в препараті з використанням методу спектрофотометрії. Проведені валідаційні характеристики з використанням критеріїв прийнятності для допусків вмісту + 5,0 % підтверджують специфічність, лінійність, прецизійність (збіжність), правильність, діапазон застосування та внутрішньолабораторну прецизійність запропонованої методики.

Ключові слова: стандартизація, антибактеріальний засіб, орнідазол, таблетки.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ

У світі щорічно реєструється близько 170 мільйонів випадків захворювань, що передаються статевим шляхом, спричинених найпростішим одноклітинним паразитом *Trichomonas Vaginalis*. [8]. Основними засобами терапії трихомонадної інфекції є препарати групи 5-нітроїмідазолів (5-НІМЗ), які володіють високим ступенем проникнення в органи і тканини. Серед препаратів цієї групи інтерес викликає препарат нового покоління – орнідазол. Висока ефективність орнідазолу, порівняно з препаратами попереднього покоління групи 5-НІМЗ, визначається швидким бактерицидним ефектом, низькою інгібуючою концентрацією у відношенні до бактерій, фармакокінетичними властивостями, які забезпечують тривалу підтримку його високих концентрацій в тканинах та рідині організму. Проте головними перевагами орнідазолу є гальмування розвитку резистентності у мікроорганізмів завдяки наявності в його молекулі хлорметильної групи та низька частота побічних ефектів, що переважно пов'язано з невеликим ступенем зв'язування з білками плазми [4].

Створення вітчизняного протипрозоїдного та антибактеріального препарату на основі субстанції орнідазолу робить актуальним розробку методів його контролю якості.

АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

Субстанція орнідазолу не описана в провідних світових фармакопеях, її якість відповідає вимогам фірми «Aarti Drugs Limited», Індія [7], і контролюється відповідно до аналітичної нормативної документації (АНД) вхідного контролю, яка складена згідно з вимогами фірми-виробника. Структурна формула орнідазолу – 1-(3-хлор-2-гідроксипропіл)-2-метил-5-нітроїмідазол – наведена на рис. 1.

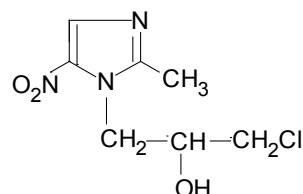


Рис. 1. Структурна формула орнідазолу

В літературі описані методи визначення орнідазолу в плазмі крові та інших біологічних рідинах за допомогою методу рідинної хроматографії [6, 9, 10], а також методи визначення орнідазолу в лікарських препаратах за допомогою методу спектрофотометрії та за допомогою використання селективних електродів [11]. Так, для кількісного визначення орнідазолу в in bulk і твердій лікарській формі закордонними авторами [13] розроблено та провалідовано два спектрофотометричних метода, які ґрунтуються на реакціях орнідазолу з парадиметиламінобензальдегідом

при температурі 37 °С (метод А) та триметоксibenзальдегідом при температурі 80 °С (метод В) за максимумами поглинання при довжині хвилі 505 нм і 385 нм відповідно. Лінійність спостерігається в діапазоні концентрацій 16-40 мкг/мл і 5-50 мкг/мл для методу А і методу В відповідно. Методи були статистично валідовані відповідно до керівництва ІСН і рекомендовані для визначення орнідазолу в *in bulk* і твердих лікарських формах. Слід зазначити, що в запропонованих методах для приготування розчину порівняння та випробовуваних розчинів наважку орнідазолу або розтертих таблеток розчиняють в дистильованій воді з додаванням 3 г гранул цинку та 10 мл хлористоводневої кислоти при температурі 80 °С протягом 10 хв, отримуючи кінцевий розчин з концентрацією орнідазолу 100 мкг/мл. Подальше проведення реакцій, як зазначено вище, також проводять при підвищених температурах. Необхідність нагрівання вихідних розчинів свідчить про обмежену розчинність орнідазолу в водних розчинах, але і інші автори також проводять визначення з використанням саме водних розчинів [12]. За даними фірми-виробника орнідазол розчинний у *метанолі Р*, *хлороформі Р* і *метиленхлориді Р*. Тому вважаємо за доцільне розглянути можливість проведення визначення орнідазолу в спиртових розчинах.

ФОРМУЛЮВАННЯ ЦІЛЕЙ СТАТТІ

Метою нашої роботи є розробка та валідація методики кількісного визначення орнідазолу в таблетках методом спектрофотометрії згідно вимог ДФУ [1-3].

ВИКЛАД ОСНОВНОГО МАТЕРІАЛУ

Об'єктом досліджень є субстанція орнідазолу та таблетки «Мерадазол» з вмістом 500 мг орнідазолу в таблетці. За описом таблетки - вкриті плівковою оболонкою білого або майже білого кольору, круглої форми з двоопуклою поверхнею. Як стандарт використовували стандартний зразок (СЗ) орнідазолу (фірми «Aarti Drugs Limited», Індія або ФСЗ ДФУ).

Аналітичні дослідження проводили методом спектрофотометрії на спектрофотометрі UV-VIS HP 8453 фірми «Hewlett Packard» (США), з використанням ваг лабораторних електронних BA-210S фірми «Sartorius» (Німеччина) та мірного посуду класу А.

На підставі проведених досліджень встановлено, що УФ-спектр поглинання спиртового розчину (96 % спирт) орнідазолу в області від 240 нм до 340 нм характеризується максимумом поглинання при довжині хвилі (312±2) нм. Наявність такого максимуму у випробовуваному розчині

свідчить про ідентичність препарату. Для кількісного визначення вмісту орнідазолу у таблетках нами була розроблена методика з використанням саме спектрофотометричного методу шляхом виміру оптичної густини випробовуваного розчину і розчину порівняння в спиртових розчинах (в концентрації 13,2 мкг/мл) при максимумі поглинання при довжині хвилі 312 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи як компенсаційний розчин 96 % *спирт Р*. На рис. 2 наведені спектри поглинання випробовуваного розчину, розчину СЗ орнідазолу і розчину «плацебо», які свідчать про збіг максимумів поглинання в випробовуваному розчині та розчині порівняння, а також про відсутність впливу допоміжних речовин на кількісне визначення в таблетках.

На підставі результатів кількісного визначення орнідазолу в препараті, а також вимог ДФУ, введений інтервал вмісту $C_7H_{10}ClN_3O_3$ (орнідазолу): від 0,475 г до 0,525 г (±5,0 % від номінального вмісту), розраховуючи на середню масу таблетки.

Оскільки методика кількісного визначення відповідно до вимог ДФУ [1-3] має бути валідована, нами була проведена валідація методики визначення орнідазолу методом спектрофотометрії для включення до аналітичної документації за основними валідаційними характеристиками: специфічність, лінійність, прецизійність (збіжність), правильність, діапазон застосування, внутрішньолабораторна прецизійність.

Допуски вмісту (В) орнідазолу в готовій лікарській формі під час зберігання складають ±5 %, тому при проведенні валідації критеріями оцінки цієї методики були параметри для В = 5,0 %, тобто максимальна невизначеність аналізу (Δ_{AS}) має бути не більше 1,6 % [3, 5].

Специфічність методики підтверджується відсутністю впливу фонового поглинання і незначною відносною систематичною похибкою (δ_{noise} (%)), яка вноситься допоміжними речовинами і можливими продуктами розкладання (табл. 1).

З даних табл. 1 видно, що не виконується співвідношення $\delta_{noise} (\%) \leq \delta_{noise}^{теор} (\%)$, але виконується співвідношення $\delta_{placebo} (\%) \leq 0,033 \cdot В$, тобто фонове поглинання «плацебо» є не значимим і методика характеризується достатньою специфічністю, а модельні розчини можливо готувати без використання «плацебо». УФ-спектри наведені на рис. 2.

Лінійність, збіжність, правильність і діапазон застосування методики визначали на модельних сумішах з відомим вмістом діючої речовини в межах від 80 до 120 % відносно номінального значення. Розчини з відомою концентрацією

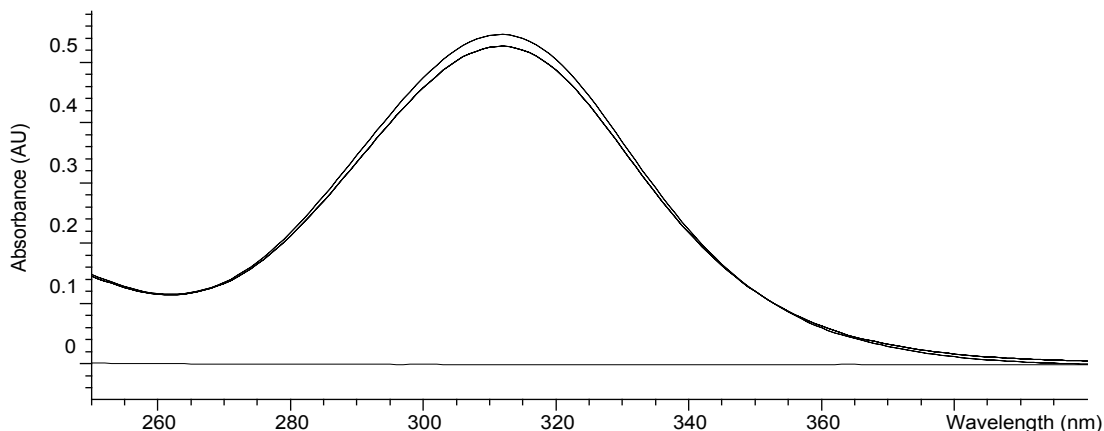


Рис. 2. УФ-спектри розчину порівняння, випробовуваного розчину і розчину «плацебо» для кількісного визначення орнідазолу в препараті «Мерадазол», таблетки

Таблиця 1

**ДАНИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ СПЕЦИФІЧНОСТІ МЕТОДИКИ
КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ОРНІДАЗОЛУ**

Оптична густина			Фактичне $\delta_{\text{placebo}} (\%)$ $\delta_{\text{placebo}} (\%) = \frac{A_{\text{placebo}}}{A_{\text{st}}} \cdot 100\%$	$\delta_{\text{imp}} (\%)$ з специфікації АНД або $\delta_{\text{imp}} (\%) = \frac{\sum A_{\text{imp},i}}{A_{\text{st}}} \times 100\%$	Фактичне $\delta_{\text{noise}} (\%)$ $\delta_{\text{noise}} (\%) = \delta_{\text{imp}} (\%) + \delta_{\text{placebo}} (\%) \leq$	Критерій $\delta_{\text{noise теор}} (\%)$
Розчин плацебо (A_{placebo})	Розчин порівняння (A_{st})	Розчин домішок ($A_{\text{imp},i}$)				
0.000179	0.546004	-	0,03 ≤ 0,033 · 5 = = 0,165	з специфікації – 1,0 %	0,03 + 1,0 = 1,03	0,51
0.000178	0.545993	-				
0.000178	0.545965	-				
Середнє $A_{\text{placebo}} =$ 0,000179	Середнє $A_{\text{st}} =$ 0,545987	Середнє $A_{\text{imp},i} =$				

отримували шляхом розведення вихідного модельного розчину. Робоча концентрація випробовуваного розчину і розчину порівняння близько 13 мкг/мл. Встановлена лінійність залежності оптичної густини розчинів орнідазолу від концентрації в області приблизно від 10 мкг/мл до 16 мкг/мл ($\pm 20\%$). На рис. 3 наведена лінійна залежність оптичної густини від концентрації орнідазолу в нормалізованих координатах.

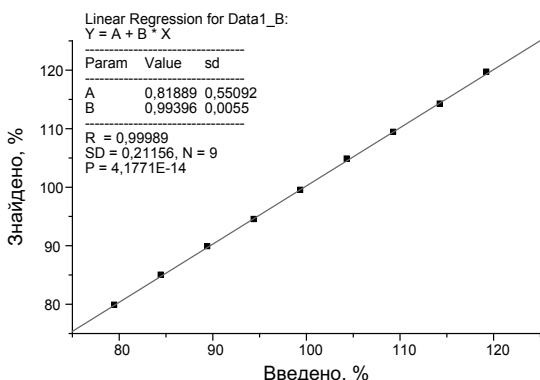


Рис. 3. Лінійна залежність оптичної густини від концентрації орнідазолу в нормалізованих координатах

Методом найменших квадратів (за даними табл. 3) проведено розрахунок параметрів лінійної залежності $Y_i = b \cdot X_i + a$ для орнідазолу (табл. 2).

Як видно з табл. 2, виконуються всі вимоги до параметрів лінійної залежності, тобто лінійність методики визначення орнідазолу підтверджується у всьому діапазоні концентрацій (80-120 %).

Високе значення коефіцієнту кореляції для валацикловіру $r = 0,99989$, також задовольняє вимогам критерію прийнятності ($r = 0,9981$) і підтверджує лінійність залежності між «введеною» і «знайденою» кількістю досліджуваної речовини (табл. 2).

З табл. 3 видно, що для орнідазолу методика аналізу характеризується достатньою прецизійністю (збіжністю), так як знайдене значення відносного довірчого інтервалу величини $Z(0,43)$ менше критичного значення для збіжності результатів (1,6 %).

Виконується критерій незначущості систематичної похибки методики – систематична похибка методики (0,23) є практично незначущою, тобто методика аналізу характеризується до-

статньою правильністю в усьому діапазоні концентрацій від 80 до 120 % (табл. 3).

Таблиця 2

**МЕТРОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ
ЛІНІЙНОЇ ЗАЛЕЖНОСТІ ДЛЯ ОРНІДАЗОЛУ**

Величина	Значення	Критерій (для допусків 95 – 105 %), g = 9)	Висновок
b	0,99396	–	–
S _b	0,0055	–	–
a	0,81889	1) ≤ 1,895 · S _a = 1,04 2) якщо не виконується 1), то ≤ 2,6	Відповідає
S _a	0,55092	–	–
S _r	0,21156	–	–
r	0,99989	≥ 0,9981	Відповідає

Таким чином, підтверджена лінійність, прецизійність (збіжність) і правильність визначення орнідазолу методом спектрофотометрії в діапазоні використання від 80 до 120 %.

Дослідження внутрішньолабораторної прецизійності проводили на 6 пробах однієї серії

препарату, різними аналітиками, в різні дні (3 дні), з використанням різного мірного посуду, шляхом оцінки значення відносного довірчого інтервалу, яке має бути менше максимально допустимі невизначеності результатів аналізу: $\Delta_{\bar{z}} \leq 1,6$ (при B = 5 %).

Внутрішньолабораторна прецизійність результатів аналізу підтверджена тим, що величина відносного довірчого інтервалу для п'яти паралельних визначень однієї серії препарату ($\Delta_{\bar{z}} = 0,82$ %) задовольняє критерію прийнятності (≤ 1,6 %) (табл. 4).

Прогнозуєма повна невизначеність результатів аналізу не має перевищувати максимально допустиму невизначеність результатів аналізу для допусків вмісту ±5,0 % – max ΔAs ≤ 1,6 %. Розрахунок ΔAs, % проводили з урахуванням невизначеності пробопідготовки та невизначеності кінцевої аналітичної операції (вимірювання): $\Delta_{As} \% = \sqrt{1,09^2 + 0,7^2} = 1,30 \% \leq \Delta_{As\text{теор}} = 1,6 \%.$

Таким чином, повна прогнозуєма невизначеність результатів для тесту «Кількісне визначен-

Таблиця 3

**РЕЗУЛЬТАТИ АНАЛІЗУ МОДЕЛЬНИХ СУМІШЕЙ І ЇХ СТАТИСТИЧНА ОБРОБКА
ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ОРНІДАЗОЛУ**

№ модельного розчину	Введено в % до концентрації розчину порівняння (X _i = C _i /C _{st} , %)	Середні значення оптичної густини (A _i) (A _{st} = 0,526254)	Знайдено в % до концентрації розчину порівняння (Y _i = A _i /A _{st} , %)	Знайдено в % до введеного (Z _i = Y _i /X _i , %)
1	79,52	0,420135	79,83	100,39
2	84,49	0,447135	84,96	100,56
3	89,46	0,472699	89,82	100,40
4	94,42	0,497137	94,47	100,05
5	99,39	0,523386	99,45	100,06
6	104,36	0,551522	104,80	100,42
7	109,33	0,575498	109,36	100,03
8	114,30	0,600864	114,18	99,89
9	119,27	0,629609	119,64	100,31
Середнє, \bar{z} , %				100,23
Відносне стандартне відхилення, RSD _z , % $RSD_z (\%) = \sqrt{\frac{\sum_i (Z_i - \bar{z})^2}{n-1}} \times \frac{100}{\bar{z}}$				0,23
Відносний довірчий інтервал, $\Delta_z (\%) = t(95\%, n-1) \times RSD_z = 1.860 \times RSD_z$, %				0,43
Критичне значення для збіжності результатів ΔAs, % (гранична невизначеність)				1,6
Систематична похибка δ = \bar{z} - 100				0,23
Критерій незначущості систематичної похибки				
1) Статистична незначущість: $\delta \% \leq \frac{\Delta_z}{\sqrt{n}} = \frac{\Delta_z}{3} = 0,43/3 = 0,14$ (0,23 ≥ 0,14) якщо не виконується вимога до критерію 1), то:				Не виконується
2) Практична незначущість: $\delta \% \leq 0,32 \times 1,6 = 0,51$ % (0,23 ≤ 0,51)				Виконується
Загальний висновок про точність методики				Коректна

РЕЗУЛЬТАТИ ПЕРЕВІРКИ ВНУТРІШНЬОЛАБОРАТОРНОЇ ПРЕЦИЗІЙНОСТІ

№ розчину	Величина Z_i , %		
	1 дослід	2 дослід	3 дослід
1	106,67	106,13	106,20
2	106,67	105,27	105,87
3	106,53	106,33	105,87
4	107,07	106,33	105,87
5	107,07	106,13	106,20
6	107,20	106,47	106,20
Середнє $\bar{Z}(\%), \bar{Z}(\%) = \frac{1}{6} \sum Z_i$	106,87	106,11	106,03
Об'єднане середнє	103,34		
Відносне стандартне відхилення, $RSD_z(\%) RSD_z = \sqrt{\frac{\sum (Z_i - \bar{Z})^2}{18} \times \frac{100}{\bar{Z}}}$	1,16		
Відносний довірчий інтервал, $\Delta_{\bar{Z}} = t(95\%, 17) \times \frac{RSD_z}{\sqrt{6}}$	$1,74 \times 1,16/\sqrt{6} = 0,82 \leq 1,6$		
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta_{As}, \%$	1,6		

ня» орнідазолу не більше критичного значення $\Delta_{A_{теор}} = 1,6 \%$, тобто методика буде давати коректні результати в інших лабораторіях.

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ РОЗВІДОК

1. Розроблено методику кількісного визначення орнідазолу в таблетках з використанням методу спектрофотометрії для включення до методів контролю якості на готову лікарську форму таблетки «Мерадазол».

2. Проведено процедуру валідації методики кількісного визначення орнідазолу, з використанням критеріїв прийнятності для допусків вмісту $\pm 5,0 \%$, яка підтверджує специфічність, лінійність, прецизійність (збіжність), правильність, діапазон застосування та внутрішньолабораторну прецизійність запропонованої методики.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Державна фармакопея України / Державне підприємство Науково-експертний фармакопейний центр. – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556 с.
2. Державна фармакопея України Допов. 1 / Державне підприємство Науково-експертний фармакопейний центр. – 1-е вид. – Х.: РІРЕГ, 2004. – 494 с.
3. Державна фармакопея України Допов. 2 / Державне підприємство Науково-експертний фармакопейний центр. – 1-е вид. – Х.: РІРЕГ, 2007. – 617 с.
4. Особливості впливу протипротозойного препарату орнідазол на організм експериментальних тварин / М.Я. Кудря, І.А. Палагіна,

- Н.В. Устенко [та ін.] // Biomedical and Biosocial Anthropology. – 2008. – №10. – С. 247-251.
5. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / Багирова В.Л., Гризодуб А.И., Чибиляев Т.Х. [и др.]; под ред. Н.В. Юргеля. – М.: Фарм. пром., 2007. – 58 с.
 6. Determination of Ornidazole in human plasma and red blood cells using high performance liquid chromatography / A. Groppi, P. Papa, M. Montagna [et al.] // J Chromatogr. – 1986. – № 380(2). – P. 437-442.
 7. Drug master file (for ornidazole) / «AARTI DRUGS LIMITED». – INDIA, 2007. – P. 68.
 8. Guidelines for treatment of sexually transmitted diseases. Centers for Disease Control and Prevention. – MMWR Recomm Rep., 1998. – № 47. – P. 111.
 9. Heizmann P. Determination of Ornidazole and its metabolites in biological fluids / P. Heizmann, R. Geschke, K. Zinapold // J Chromatogr. – 1990. – № 534. – P. 233-240.
 10. Measurement of Ornidazole by high performance liquid chromatography / H. Merdjan, C. Bonnat, E. Singlas [et al.] // J Chromatogr. – 1983. – № 273(2). – P. 475-480.
 11. Mohammed H. Spectrophotometric quantitation of Ornidazole and its formulations / H. Mohammed // Pharm. analysis. – 1989. – № 22(2). – P. 111-121.
 12. Quantitative spectrophotometric determination of ornidazole tablet formulations using ibuprofen sodium as hydrotropic solubilizing agent / R.K. Maheshwari, S.R. Bishnoi, D. Kumar [et al.] // Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures. – 2010. – Vol. 5, № 1. – P. 97-100.
 13. Spectrophotometric Method for Determination of Ornidazole / G. Mubeen, V. Prakash, P.L. Somashekar [et al.] // Interna. J. of ChemTech Research. – 2009. – Vol. 1, № 2. – P. 318-321.

УДК 615.07:615.281/.282:615.453.6

Л.А. Бобрицкая, Е.С. Назарова, Ю.М. Вербова

**РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТАБЛЕТОК С ОРНИДАЗОЛОМ**

Разработана методика количественного определения орнидазола в препарате с использованием метода спектрофотометрии. Проведенные валидационные характеристики с использованием критериев приемлемости для допусков содержания $\pm 5,0\%$ подтверждают специфичность, линейность, прецизионность (сходимость), правильность, диапазон применения и внутрилабораторную прецизионность.

Ключевые слова: стандартизация, антибактериальное средство, орнидазол, таблетки.

УДК 615.07:615.281/.282:615.453.6

L.A. Bobritskaya, E.S. Nazarova, J.M. Verbova

**WORKING OUT AND VALIDATION THE METHOD OF QUANTITATIVE
DETERMINATION OF TABLETS WITH ORNIDAZOLE**

The method of quantitative determination of ornidazole of the preparation by the method spectrophotometric is developed. Spent validation researches, with use of criteria of an acceptability for maintenance admissions $\pm 5,0\%$, confirm specificity, linearity, precision (repeatability), accuracy, a range of application and intermediate precision the offered method.

Key words: standardization, anti-infective preparation, ornidazole, pill.

Адреса для листування:

61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4

Тел: (0572) 67-88-52

Надійшла до редакції:

06.03.2012