

УДК 547.78:547.814:547.9:615.074:615.4

В. І. ГУСАРОВ, С. М. КОВАЛЕНКО, Т. Д. ГУСАРОВА

Національний фармацевтичний університет

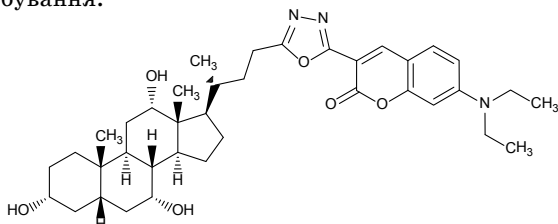
## ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ СУБСТАНЦІЇ 7-(ДІЕТИЛАМІНО)-3-(5-(1-МЕТИЛ-1-(3,7,12-ТРИГІДРОКСИ-10,13-ДИМЕТИЛГОНАН-17-ІЛ)-ПРОП-3-ІЛ)-1,3,4-ОКСАДІАЗОЛ-2-ІЛ)-КУМАРИНУ

*Проведено валідацію методики кількісного визначення субстанції 7-(діетиламіно)-3-(5-(1-метил-1-(3,7,12-тригідрокси-10,13-диметилгонан-17-іл)-проп-3-іл)-1,3,4-оксадіазол-2-іл)-кумарину методом неводного титрування. Визначено валідаційні характеристики та експериментально підтверджено їх відповідність необхідним критеріям прийнятності.*

**Ключові слова:** валідація, критерії прийнятності, кількісне визначення, субстанція.

### ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ

Жовчні кислоти та їх похідні широко використовуються у фармації, медицині та інших галузях народного господарства [11]. Нами запропоновано синтетичні підходи до створення сполук на базі кумаринового ядра, що містили залишок холестерої кислоти, який приєднаний через 1,3,4-оксадіазольний місток [2, 7, 8] та досліджені їх спектральні властивості. Сполуку з найбільш вираженою здатністю до флуоресценції – 7-(діетиламіно)-3-(5-(1-метил-1-(3,7,12-тригідрокси-10,13-диметилгонан-17-іл)-проп-3-іл)-1,3,4-оксадіазол-2-іл)-кумарин (рис. 1) – запропоновано у якості діагностикуму – маркера ступеню всмоктування жирних кислот. Під час розробки проекту методик контролю якості (МКЯ) на субстанцію відповідно до вимог провідних Фармакопей з використанням рекомендацій [1, 3, 10] було проведено валідаційні випробування.



**Рис. 1.** 7-(діетиламіно)-3-(5-(1-метил-1-(3,7,12-тригідрокси-10,13-диметилгонан-17-іл)-проп-3-іл)-1,3,4-оксадіазол-2-іл)-кумарин.

© В. І. Гусаров, С. М. Коваленко, Т. Д. Гусарова, 2012

### АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

Основним національним документом, що регламентує показники, за якими контролюється якість субстанцій для фармацевтичного застосування, є Державна Фармакопея України (ДФУ) [4-6]. Згідно ДФУ для кількісного визначення основної речовини в субстанції бажане використання прямих методів аналізу, тому найпоширенішим методом кількісного визначення субстанцій для фармацевтичного застосування є титрування. Для субстанцій, титриметричне визначення яких утруднене (деякі антибіотики, інсуліни, рослинна сировина) використовують рідинну хроматографію, що вимагає використання атестованих стандартних зразків. Інші методи, наприклад, біологічні (імунобіологічні субстанції) або визначення питомого показника поглинання (варфарин натрію, що містить кумариновий фрагмент як і наша сполука) використовують рідко [9]. Недоліком спектрофотометричного методу є вірогідність отримання хибних результатів у випадку якщо домішки субстанції будять мати однакові із субстанцією максимуми поглинання. Враховуючи вищезазначене, як метод кількісного визначення було обрано титрування.

Субстанція містить азотовмісний гетероцикл та третинну аміногрупу та може бути відтитрована як основа. Для сполук, що виявляють властивості слабких основ, титрування яких у воді утруднене або неможливе через слабкі кислотно-

основні властивості або малу розчинність, фармакопейним є метод кислотно-основного титрування у неводних розчинниках.

### ФОРМУЛЮВАННЯ ЦІЛЕЙ СТАТТІ

Метою роботи було проведення валідації розробленої методики кількісного визначення субстанції 7-(діетиламіно)-3-(5-(1-метил-1-(3,7,12-тригідрокси-10,13-диметилгетанон-17-іл)-проп-3-іл)-1,3,4-оксадіазол-2-іл)-кумарин для визначення відповідності необхідним критеріям прийнятності.

### ВИКЛАД ОСНОВНОГО МАТЕРІАЛУ

На підставі отриманих експериментальних даних розділ «Кількісне визначення» введено до проекту МКЯ в наступній редакції.

«0,200 г субстанції розчиняють в 10,0 мл метанолу *P*, додають 40 мл кислоти оцтової безводної *P*, та титрують 0,05 *M* розчином хлорної кислоти потенціометрично (ДФУ, 2.2.20) до першого стрибка потенціалів на кривій титрування.

1 мл 0,05 *M* розчину хлорної кислоти відповідає 32,39 мг  $C_{38}H_{53}N_3O_6$ .

Вміст  $C_{38}H_{53}N_3O_6$  обчислюють за формулою:

$$X = \frac{V \cdot 0,03239 \cdot K \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot (100 - W)}, \text{ де:}$$

*V* – об'єм 0,05 *M* розчину хлорної кислоти, витрачений на титрування випробовуваного зразка, мл;

*K* – поправковий коефіцієнт до молярності титранту;

0,03239 – кількість грам  $C_{38}H_{53}N_3O_6$ , що відповідає 1 мл 0,05 *M* розчину хлорної кислоти;

*m* – маса наважки субстанції;

*W* – вміст води у субстанції, %.

Проводять не менше трьох паралельних визначень. За результат приймають середнє значення вмісту  $C_{38}H_{53}N_3O_6$ .

Вміст  $C_{38}H_{53}N_3O_6$  від 99,0 % до 101,0 % у перерахунку на безводну речовину»

Валідаційними характеристиками методу кількісного визначення відповідно до вимог ДФУ є: специфічність, лінійність, правильність, прецизійність, збіжність (повторюваність), проміжна (внутрішньолабораторна) прецизійність.

Для оцінки коректності методики при виконанні аналізу в іншій лабораторії проведено розрахунок прогнозованої повної невизначеності аналізу  $\Delta_{As}$  і її порівняння з максимально припустимою невизначеністю результатів аналізу, що пов'язана з допусками вмісту аналізованої речовини в субстанції згідно МКЯ. Для допусків вмісту  $\pm 1,0$  %  $\max \Delta_{As}$  становить 1,0 %. Враховували невизначеність пробопідготовки  $\Delta_{Sp}$  та невизначеність кінцевої аналітичної операції  $\Delta_{FAO}$ . Згідно рекомендацій ДФУ, прогнозована невизначеність пробопідготовки має бути незначуща, тобто  $\Delta_{Sp} \leq 0,32 \Delta_{As} = 0,32 \times 1,0 = 0,32$  %.

При використанні титриметричних методик аналізу джерелами невизначеності результату при пробопідготовці є невизначеність вимірювальних приладів (ваги). Невизначеність результату кінцевої аналітичної операції пов'язана з вимірюванням об'єму титрованого розчину (бюретка) і визначення поправкового коефіцієнта до розчину титранту. Розрахунки наведено в табл. 1.

Прогнозована невизначеність пробопідготовки виявилася незначущою та становила:

$$\Delta_{FAO} = \sqrt{0,057^2 + 0,2^2 + 0,25^2 + 0,25^2} = 0,41.$$

Прогнозована величина повної невизначеності аналізу становила:

$$\Delta_{As} = \sqrt{0,001^2 + 0,41^2} = 0,41$$

Таким чином, повна прогнозована невизначеність ( $\Delta_{As}$ ) аналітичної методики кількісного визначення субстанції не перевищує максимально допустимої повної відносної невизначеності результатів аналізу.

Таблиця 1

### РОЗРАХУНОК НЕВИЗНАЧЕНОСТІ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ

Фактор	Розрахунок невизначеності, %
<b>Пробопідготовка:</b> - взяття наважки 200 мг.	$\Delta_{m1} = 0,2/200 \times 100\% = 0,1$
<b>Кінцева аналітична операція:</b> - невизначеність концентрації 0,05 <i>M</i> розчину хлорної кислоти: • наважка калію гідрофталату РО при встановленні титру 0,1 <i>M</i> розчину хлорної кислоти – 350 мг; • розведення 0,1 <i>M</i> розчину хлорної кислоти – 25,0 мл в колбі на 50,0; • встановлення титру – бюретка 25 мл з невизначеністю 0,05 мл) - невизначеність титрування субстанції (бюретка 25 мл з невизначеністю 0,05 мл)	$\Delta_{m2} = 0,2/350 \times 100\% = 0,057$ $\Delta_{v1} = \sqrt{0,1 + 0,17} = 0,2$ $\Delta_{v2} = 0,05 \times 100/20 = 0,25$ $\Delta_{v3} = 0,05 \times 100/20 = 0,25$

Специфічність аналітичної методики перевіряли шляхом титрування холостого розчину (містив 10,0 мл метанолу *P* та 40 мл кислоти оцтової безводної *P*) умовах експерименту. Було визначено, що об'єм титранту, що витрачається на титрування холостого розчину, становить 1 краплю ( $\leq 0,05$  мл), отже, методика характеризується достатньою специфічністю.

Вивчення лінійності проводили одночасно з правильністю і прецизійністю (збіжністю) на 9-ти розчинах. Використовували по 3 розчини 3 концентрацій (80, 100 та 120 %). Результати визначення та їх статистична обробка наведені в табл. 2.

На рис. 2 наведено графік лінійної залежності аналітичного сигналу від наважки субстанції, який побудований в нормалізованих координатах, виходячи з отриманих даних. Розрахунок параметрів лінійної залежності  $Y_i = b \cdot X_i + a$  проведено методом найменших квадратів, результа-

ти порівняння розрахованих величин з критеріями прийнятності представлено в табл. 3.

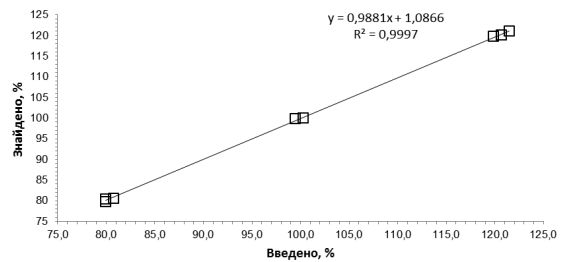


Рис. 2. Залежність аналітичного сигналу від наважки субстанції в нормалізованих координатах

Таким чином, всі вимоги до параметрів лінійної залежності задовольняють критеріям прийнятності (табл. 3).

Результати порівняння значення відносного довірчого інтервалу величини *Z* з критичним значення для збіжності результатів ( $0,70 \leq 1,0$  %)

Таблиця 2

РЕЗУЛЬТАТИ, ОТРИМАНІ ПРИ ВИЗНАЧЕННІ ЛІНІЙНОСТІ, ПРАВИЛЬНОСТІ, ПРЕЦИЗІЙНОСТІ

Номер зразка розчину	Наважка субстанції (ВВЕДЕНО, $X_i$ ), мг	С, % від номіналу	V титранту, мл	Визначено субстанції, (ЗНАЙДЕНО, $Y_i$ ) мг Титр 1,007	С, % від номіналу	Відношення ЗНАЙДЕНО/ ВВЕДЕНО $Z = X_i/Y_i \times 100\%$
1,1	159,6	79,8	4,90	159,8	79,9	100,14
1,2	160,9	80,5	4,90	159,8	79,9	99,33
1,3	161,1	80,6	4,95	161,5	80,7	100,22
2,1	200,1	100,1	6,15	200,6	100,3	100,25
2,2	200,2	100,1	6,15	200,6	100,3	100,20
2,3	199,7	99,9	6,10	199,0	99,5	99,63
3,1	242,0	121,0	7,45	243,0	121,5	100,41
3,2	240,1	120,1	7,40	241,4	120,7	100,53
3,3	239,7	119,9	7,35	239,7	119,9	100,01
Середнє значення, $\bar{Z}$ , %						100,08
Відносне стандартне відхилення, $RSD_z$ , % $RSD_z(\%) = \sqrt{\frac{\sum (Z_i - \bar{Z})^2}{n-1}} \times \frac{100}{\bar{Z}}$						0,38
Відносний довірчий інтервал, $\Delta_z(\%) = t(95\%, n-1) \cdot RSD_z = 1,8595 \cdot RSD_z$ , %						0,70
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta_{As}$ , % (гранична невизначеність)						1,0
Систематична похибка $\delta =  \bar{Z} - 100 $						0,08
Критерій незначущості систематичної похибки: статистична незначущість: $\delta\% \leq \frac{\bar{Z}}{\sqrt{n}} = \frac{100}{3} = 0,70/3 = 0,23$ (0,08 $\leq$ 0,23)						Виконується
якщо не виконується вимога до критерію 1), то: практична незначущість: $\delta\% \leq 0,32 \cdot 1,0 = 0,32$ % (0,08 $\leq$ 0,32)						Виконується
Висновок про адекватність методики						Коректна

Таблиця 3

## КРИТЕРІЇ ПРИЙНЯТНОСТІ ПРИ ВИЗНАЧЕННІ ЛІНІЙНОСТІ

Вимоги	Загальні	Для допусків 99-101 %, n=9	Отримано	Висновок
до вільного члена (a)	$ a  \leq \Delta_a = t(95\%, n-2) \cdot s_a$	$ a  \leq 1,60$	1,09	Виконується
до залишкового стандартного відхилення ( $s_0$ )	$\frac{s_0}{b} \leq \frac{\Delta_{As}(\%) }{t(95\%, n-2)}$			Виконується
до коефіцієнта кореляції (r)	$r \leq \sqrt{1 - \left( \frac{\Delta_{As}}{s_y \cdot t(95\%, n-2)} \right)^2}$	$r \geq 0,99926$	0,9998	Виконується

свідчить про задовільну прецизійність методики (табл. 3).

Правильність методики в діапазоні концентрацій від 80 до 120 % підтверджується виконанням критеріїв статистичної і практичної незначущості систематичної похибки методики (табл. 3).

#### ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ РОЗВІДОК

1. Розроблено та проведено валідацію методики кількісного визначення субстанції 7-(діетиламіно)-3-(5-(1-метил-1-(3,7,12-три-гідрокси-10,13-диметилгетан-17-іл)-проп-3-іл)-1,3,4-оксадіазол-2-іл)-кумарин методом титрування у неводних розчинниках.

2. Проведені валідаційні дослідження для тесту «Кількісне визначення» підтверджують відповідність таких валідаційних характеристик, як прогноз повної невизначеності аналізу, специфічність, лінійність, правильність, прецизійність, збіжність (повторюваність) критеріям прийнятності.

3. Методика вважається валідованою та може бути використана для кількісного визначення субстанції 3-{5-(3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -тригідроксихоліл)-1,3,4-оксадіазол-2-іл}-7-(Et)<sub>2</sub>N-кумарину методом неводного титрування.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

- Гризодуб А.И. Стандартные процедуры валідації методик контролю качества лекарственных средств / А.И. Гризодуб // Фармаком. – 2006. – №1/2. – С. 3-44.
- Гусаров В. І. Виділення жовчних кислот з жовчі великої рогатої худоби / В. І. Гусаров, С. М. Коваленко, Л. В. Євсєєва // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2012. – № 2(9). – С. 41-43.
- Валідація аналітичних методик для виробителів лікарств: Типовое руководство

предприятия по производству лекарственных средств / Под редакцией В.В. Береговых – М. : Литтера, 2008.

- Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків : РІРЕГ, 2001. – 556 с.
- Державна фармакопея України Допов. 1 / Державне підприємство Науково-експертний фармакопейний центр. – 1-е вид. – Х. : РІРЕГ, 2004. – 494 с.
- Державна фармакопея України Допов. 2 / Державне підприємство Науково-експертний фармакопейний центр. – 1-е вид. – Х. : РІРЕГ, 2007. – 617 с.
- Пат. 72609 Україна, МПК (2012.01) C07D 413/02, C07J 9/00. 3-(5-((R)-3-((3R, 5S, 7R, 8R, 9S, 10S, 12S, 13R, 14S, 17R)-3,7,12-тригідрокси-10,13-диметилгексадекагідро-1H-циклопента[а]фенантрен-17-іл)бутил)-1,3,4-оксадіазол-2-іл)-2H-хромен-2-он та його похідні / Коваленко С. М., Ніколаєнко П. В., Гусаров В. І., Заремба О. В. ; заявник та патентовласник Національний фармацевтичний університет. – №u201201125; заявл. 03.02.12; опубл. 27.08.12, Бюл. № 16.
- Препаративна очистка синтетичних кумаринів, що містять залишок холестерину / В. І. Гусаров, С. М. Коваленко, О. В. Заремба, Т. Д. Гусарова // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2012. – № 3(10). – С. 42-45.
- European Pharmacopoeia. – 7th ed. – Strasbourg: EDQM. – 2007.
- ICH Topic Q 2 (R1). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. – EMEA, 2006. – 14 p.
- Mukhopadhyay S. Chemistry and biology of bile acids / S. Mukhopadhyay, U. Maitra // Current Science. – 2004. – Vol. 87, № 12. – P. 1666-1683.

**УДК 547.78:547.814:547.9:615.074:615.4**

**В. И. Гусаров, С. Н. Коваленко, Т. Д. Гусарова**

**ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБСТАНЦИИ  
7-(ДИЭТИЛАМИНО)-3-(5-(1-МЕТИЛ-1-(3,7,12-ТРИГИДРОКСИ-10,13-ДИМЕТИЛГОНАН-  
17-ИЛ)-ПРОП-3-ИЛ)-1,3,4-ОКСАДИАЗОЛ-2-ИЛ)-КУМАРИНА**

Проведена валидация методики количественного определения субстанции 3-{5-(3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -тригидроксиголил)-1,3,4-оксадиазол-2-ил}-7-(Et)2N-кумарина методом неводного титрования. Определены валидационные характеристики и экспериментально подтверждено их соответствие необходимым критериям приемлемости.

**Ключевые слова:** валидация, критерии приемлемости, количественное определение, субстанция.

**UDC 547.78:547.814:547.9:615.074:615.4**

**V. I. Gusarov, S. M. Kovalenko, T. D. Gusarova**

**VALIDATION METHOD FOR ASSAY OF SUBSTANCE 7-(DIETHYLAMINO)-  
3-(5-(1-METHYL-1-(3,7,12-TRIHYDROXY-10,13-DIMETHYLGONAN-  
17-YL)-PROP-3-YL)-1,3,4-OXADIAZOL-2-YL)-COUMARIN**

Conducted validation method for assay of non-aqueous titration method of substance 7-(diethylamino)-3-(5-(1-methyl-1-(3,7,12-trihydroxy-10,13-dimethylgonan-17-yl)-prop-3-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)-coumarin. Defined validation characteristics and experimentally confirmed their compliance with the required acceptable criteria.

**Key words:** assay, substance, validation, acceptable criteria.

*Адреса для листування:*

61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4.

Кафедра управління якістю НФаУ

gusarov-victor@rambler.ru

*Надійшла до редакції:*

24.11.2012