

УДК 615.25:615.454.2:54.061/062

В. І. Гриценко, О. А. Рубан, В. І. Гусаров, С. М. Губарь

*Національний Фармацевтичний університет, м. Харків*

## **ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ДІЮЧОЇ РЕЧОВИНИ ТАМСУЛОЗИНУ ГІДРОХЛОРИДУ В СУПОЗИТОРІЯХ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ГІПЕРПЛАЗІЇ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ**

*Проведено валідацію запропонованої раніше методики кількісного визначення діючої речовини тамсулозину гідрохлориду методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) у супозиторіях «Тамсулопрост» для лікування гіперплазії передміхурової залози. Визначені специфічність, лінійність, правильність та внутрішньолaboratorна прецизійність методики.*

*Результати проведених досліджень показали, що методика визначення тамсулозину в супозиторіях методом ВЕРХ задовольняє критеріям прийнятності валідаційних показників.*

*Ключові слова:* валідація, супозиторії, тамсулозину гідрохлорид.

### **ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ**

Доброякісна гіперплазія передміхурової залози (ДГПЗ) – широко розповсюджене захворювання у чоловіків старше 50 років, причому, частота його виникнення збільшується з віком [6]. Проблема лікування хворих на ДГПЗ є дуже актуальною в наш час.

### **АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ**

На сьогодні застосування  $\alpha$ -адреноблокаторів являється основним методом лікування у пацієнтів з клінічними проявами ДГПЗ. Прийом цих препаратів сприяє зменшенню патологічної симптоматики і підвищенню якості життя пацієнтів [2]. Враховуючи те, що на фармацевтичному ринку повністю відсутні лікарські препарати з  $\alpha$ -адреноблокаторами у формі супозиторіїв (найбільш прийнятна лікарська форма для лікування захворювань передміхурової залози), розробка і впровадження препаратів простатопротекторної дії у формі супозиторіїв являється перспективним напрямком сучасної фармацевтичної науки [5].

### **ВИДІЛЕННЯ НЕ ВИРІШЕНИХ РАНІШЕ ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ**

На кафедрі заводської технології ліків Національного фармацевтичного університету під

керівництвом проф. Рубан О.А. створено супозиторії з  $\alpha$ -адреноблокатором тамсулозину гідрохлоридом для лікування гіперплазії передміхурової залози.

### **ФОРМУЛЮВАННЯ ЦІЛЕЙ СТАТТІ**

Метою нашої роботи стала валідація методики кількісного визначення діючої речовини тамсулозину гідрохлориду у супозиторіях «Тамсулопрост» для лікування гіперплазії передміхурової залози.

### **ВИКЛАД ОСНОВНОГО МАТЕРІАЛУ ДОСЛІДЖЕННЯ**

Об'єктами досліджень стали зразки супозиторіїв з тамсулозину гідрохлоридом масою 1,6 г, виготовлені на основі твердого жиру методом виливання. З метою оптимізації складу супозиторіїв до основи вводили емульгатор Lanette SX в кількості 5 %.

Валідація методик кількісного визначення методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) складається з перевірки придатності системи та валідації методу. Контрольовані валідаційні характеристики обрані відповідно до вимог ДФУ та рекомендацій ІСН [1].

Методика, валідацію якої проводили, запропонована нами раніше [3]. Для валідаційних процедур використовували розрахунок прогнозованої повної невизначеності аналізу та її порівняння з максимально допустимою повною

відносно невизначеністю. Повна невизначеність аналізу ( $\Delta_{AS}$ ) визначається як сума невизначеності пробопідготовки і невизначеність кінцевої аналітичної операції  $\Delta_{AS} = \sqrt{(\Delta_{sp})^2 + (\Delta_{FAO})^2}$ .

Для розрахунків невизначеності використовували дані методики, яку валідують (приготування випробовуваного розчину: наважка супозиторної маси 3,2 г, об'єм екстрагенту 25 мл; розчин порівняння – наважка стандарту 0,080 г, мірна колба місткістю 100 мл, аліквота 2 мл, мірна колба місткістю 50 мл). Результати прогнозу невизначеності пробопідготовки наведені в табл. 1.

Таблиця 1

### ВИЗНАЧЕННЯ НЕВИЗНАЧЕНОСТІ ПРОБОПІДГОТОВКИ

Операція пробопідготовки		Невизначеність, %
Розчин порівняння		
Взяття наважки, мг	80	0,25
Доведення в мірній колбі, мл	100	0,12
Відбір аліквоти піпеткою (піпетка/аліквота), мл	2	0,50
Доведення в мірній колбі, мл	50	0,17
Випробовуваний розчин		
Взяття наважки, мг	3200	0,01
Доведення в мірній колбі, мл	25	0,23
Невизначеність пробопідготовки, $\Delta_{sp}$	0,64	

Визначення невизначеності кінцевої аналітичної операції  $\Delta_{FAO}$  проводили для випробовуваного розчину і розчину порівняння. При розрахунку довірчих інтервалів використовували односторонній коефіцієнт Стюдента для ймовірності 95 % і відповідне число ступенів свободи.

Невизначеність кінцевої аналітичної операції (розрахунок проводили згідно) при приготуванні розчину порівняння ( $\Delta_{FAO}^{cm}$ ) та випробовуваного розчину ( $\Delta_{FAO}^{smp}$ ) склали по 1,24 % [4]. Сумарна невизначеність кінцевої аналітичної операції  $\Delta_{FAO}$  дорівнює 1,8 %, а повна невизначеність методики аналізу  $\Delta_{AS}$  складає 1,86 %.

Таким чином, розрахункова повна невизначеність методики аналізу  $1,86 < \max \Delta_{AS}, (\max \Delta_{AS} = 3,2)$ , що відповідає вимогам до цього параметру. Можна зробити висновок, що повна прогнозована невизначеність аналітичної методики визначення тамсулозину гідрохлориду в препараті не перевищує гранично допустимої невизначеності результатів.

Для вивчення специфічності готували розчини: бланк-розчин, розчин плацебо, розчин порівняння (розчин стандартного зразка тамсулозину в номінальній концентрації), випробуваний розчин.

На хроматограмі розчину плацебо, бланк-розчину відсутні піки, що збігаються за часом утримування з піком тамсулозину на хроматограмі розчину стандартного зразка. Хроматограми розчинів представлені на рисунках 1 – 4.

При кількісному визначенні діапазон застосування повинен становити від 80 до 120 % від обраної концентрації аналізованої речовини. Готували 9 модельних розчинів, в яких концентрація тамсулозину змінюється в межах діапазону використання. Розрахунки проводили для нормалізованих величин  $X_i = C_i/C_{st} \cdot 100$  і  $Y_i = S_i/S_{st} \cdot 100$ . Для модельних розчинів методом найменших квадратів визначали параметри лінійної залежності: вільний член а, залишкове стандартне відхилення, коефіцієнт кореляції, і оцінюють їх за критеріями прийнятності.

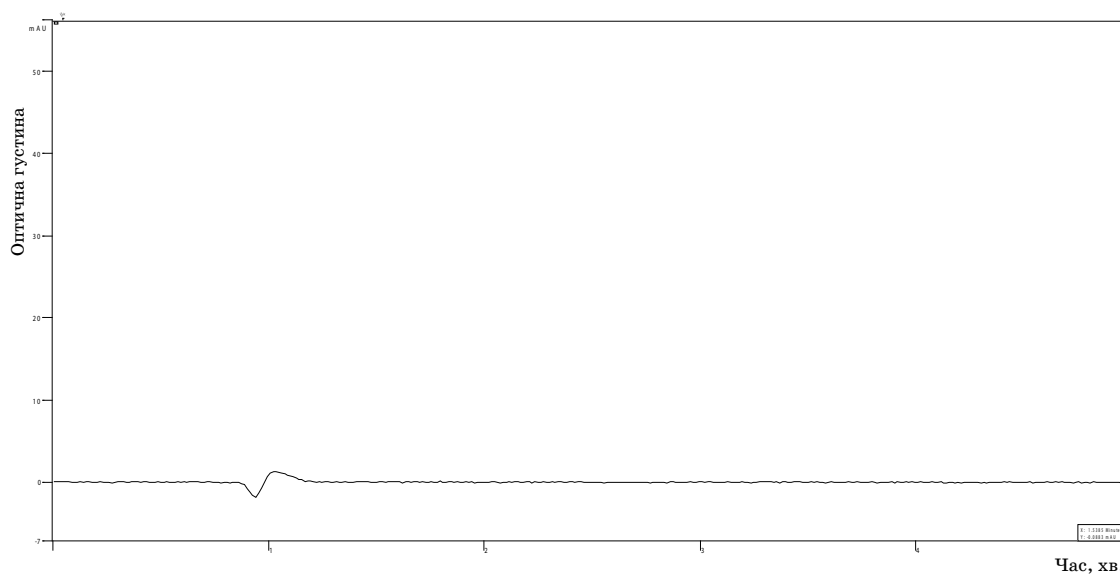


Рис. 1. Хроматограма розчинника (бланк-хроматограма)

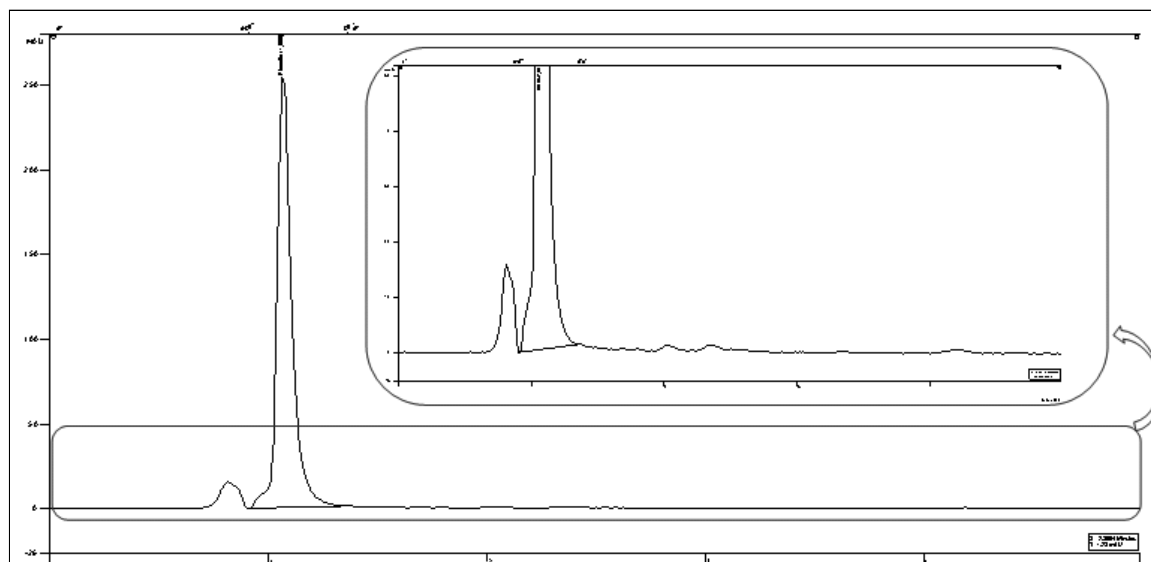


Рис. 2. Хроматограма розчину плацебо

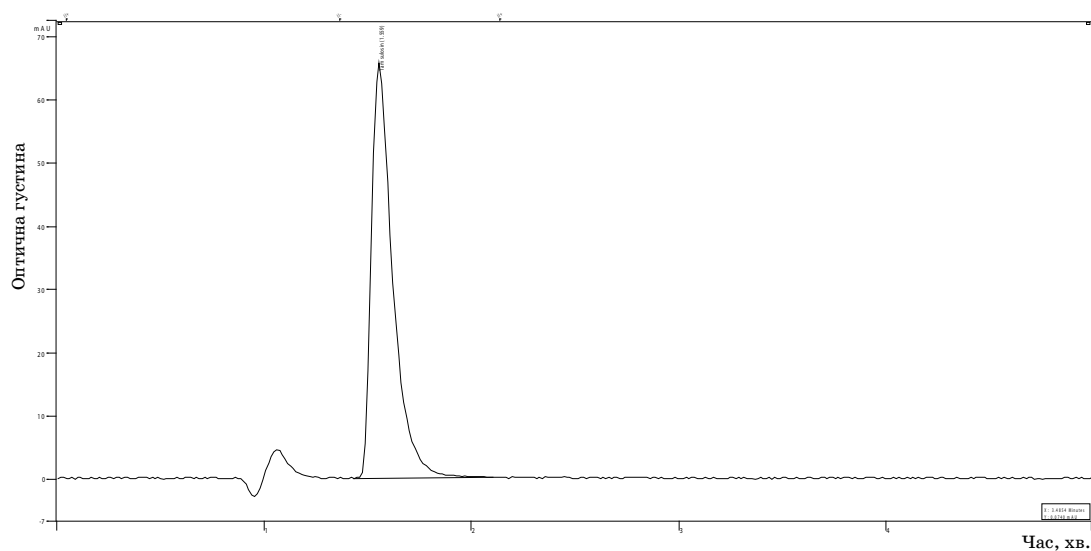


Рис. 3. Хроматограма розчину стандартного зразка тамсулозину

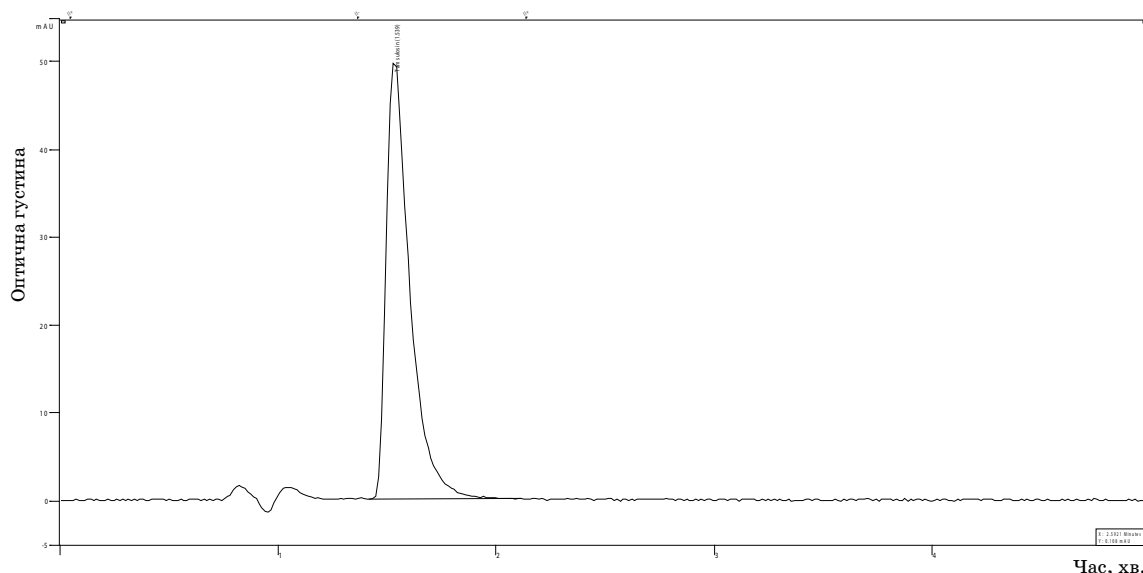


Рис. 4. Хроматограма випробовуваного розчину

Результати хроматографування узагальнені в табл. 3. На рисунку 5 представлений графік лінійної залежності площі піка від фактичної концентрації розчину.

Для модельних розчинів методом найменших квадратів розраховані параметри лінійної залежності: вільний член  $a$  (в одиницях площі та у відсотках до середнього значення), залишкове стандартне відхилення, коефіцієнт кореляції. Критерії прийнятності наведені в табл. 4.

Виходячи з отриманих результатів можна зробити висновок, що методика в діапазоні кон-

центрацій від 80 до 120 % від номінального значення для тамсулозину є лінійною.

Правильність вивчали методом добавок на модельних розчинах, приготуєваних з наважки супозиторної маси (модельна суміш), в якій попередньо було проведено визначення вмісту тамсулозину і розчину субстанції з точно відомою концентрацією тамсулозину.

Для визначення правильності в межах діапазону використання аналітичної методики були приготуєвані дев'ять випробовуваних розчинів (незалежні наважки). Концентрація тамсулозину в розчинах складала от 80 до 120 % від номінальної.

Таблица 3

**ДАНИ ПЕРЕВІРКИ ЛІНІЙНОСТІ МЕТОДИКИ**

№	Розчин (код)	Наважка ст-ту, мг	Площа піку	$C_i$	$S_{i/st}$	$C_{i/st}$	$S_{i/st}/C_{i/st} \cdot 100$
1	val_tams_l80	63,4	2018325	0,025	79,0	78,9	100,1
2	val_tams_l85	67,2	2136855	0,027	83,6	83,6	100,0
3	val_tams_l90	77,1	2446607	0,031	95,7	95,9	99,8
4	val_tams_l95	78,9	2501990	0,032	97,9	98,1	99,8
5	val_tams_l100	78,6	2496690	0,031	97,7	97,8	99,9
6	val_tams_l105	86,4	2738625	0,035	107,2	107,5	99,7
7	val_tams_l110	86,9	2766427	0,035	108,2	108,1	100,1
8	val_tams_l115	83,2	2647033	0,033	103,6	103,5	100,1
9	val_tams_l120	89,7	2848003	0,036	111,4	111,6	99,9
Ст-пр	val_tams_rs	80,4	2555854,5	0,032			

$$\Sigma = 99,9$$

$$\delta = 0,16$$

$$s, \% = 0,16$$

$$\Delta z \% = 0,31$$

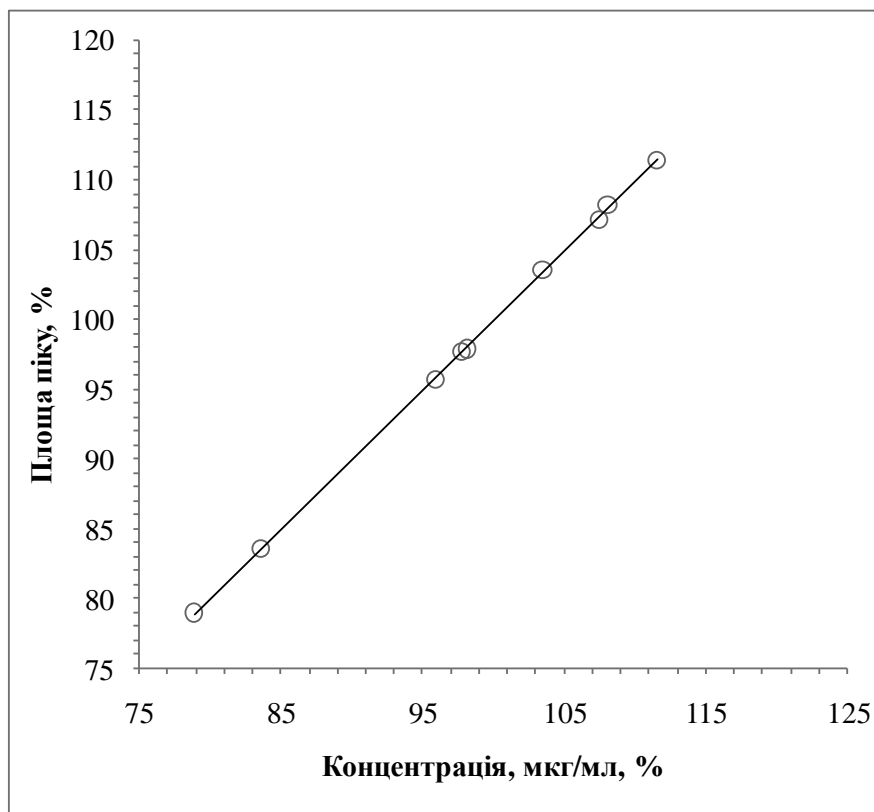


Рис. 5. Графік лінійної залежності  $Y_i = b \times X_i + a$

Таблиця 4

**ДАНІ ПЕРЕВІРКИ ЛІНІЙНОСТІ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ**

Критерій	Вимоги	Отримані значення	Виконання критерію
	$ a  \leq 5.1$ $S_0 \leq 1.69$ $r > 0.99236$	$ a  = 0,41$ $S_0 = 0,31$ $r > 0,999$	виконується виконується виконується

Виконання критеріїв правильності та збіжності для визначення тамсулозину в готовій лікарській формі методом ВЕРХ наведена в табл. 5. При визначенні прецизійності (збіжності) односторонній довірчий інтервал  $\Delta_z$  не повинен перевищувати максимальну невизначеність результатів аналізу.

Таблиця 5

Значення	Вимоги статистичної незначущості	Вимоги практичної незначущості	Виконання критерію	
$\left  \frac{\bar{Z} - 100}{\bar{Z}} \right $	0,14	$\leq 0.22\%$	$\leq 1.02\%$	Виконується по першому і другому критерію

Методика визначення тамсулозину в супозиторіях методом ВЕРХ задовольняє критеріям прийнятності валідаційного показника «Правильність».

Для визначення прецизійності розраховували стандартне відхилення, відносне стандартне відхилення, довірчий інтервал. Збіжність досліджували на 6 випробовуваних розчинах.

Визначення параметрів збіжності та розрахунок критеріїв збіжності наведені в табл. 6. Односторонній довірчий інтервал  $\Delta Z$  не повинен перевищувати повну невизначеність результатів аналізу ( $\leq 3,2\%$ ).

Для визначення внутрішньолабораторної (проміжної) прецизійності використовували результати дослідження 6 проб одного зразка двома аналітиками в різні дні протягом одного робочого тижня з використанням різного мірного посуду. Для порівняння середніх результатів двох вибірок перевіряли їх на відповідність критерію Фішера і критеріям порівняння результатів двох вибірок.

Визначення параметрів проміжної прецизійності і розрахунок її представлений в табл. 7.

Таблиця 6

## РОЗРАХУНОК ПАРАМЕТРІВ ЗБІЖНОСТІ

Розчин (код)	Наважка супозиторної маси, г	Площа піку	Вміст тамсулозину, мг/суп
val_tams_prec1_1	5,2994	4164833	0,396
val_tams_prec1_2	5,0354	3975138	0,397
val_tams_prec1_3	5,0051	4029840	0,405
val_tams_prec1_4	5,2874	4157366	0,396
val_tams_prec1_5	5,0287	3952039	0,396
val_tams_prec1_6	5,2691	4235948	0,405
$Z_{cp}$			0,3990
Відносне стандартне відхилення, $S_z(\%)$			1,1632
Довірчий інтервал, $\Delta Z = t(95\%, 5) * S_z(\%) = 2,5706 * S_z(\%)$			2,99

## РОЗРАХУНОК ПАРАМЕТРІВ ЗБІЖНОСТІ

Розчин (код)	Наважка супозиторної маси, г	Площа піку	Вміст тамсулозину, мг/суп
val_tams_prec2_1	3,2145	2551474	0,400
val_tams_prec2_2	3,2514	2580742	0,399
val_tams_prec2_3	3,5412	2800784	0,398
val_tams_prec2_4	3,6505	2901548	0,400
val_tams_prec2_5	3,3054	2634647	0,401
val_tams_prec2_6	3,3985	2684514	0,398
$Z_{cp}$			0,3993
Відносне стандартне відхилення, $S_z(\%)$			0,3293
Довірчий інтервал, $\Delta Z = t(95\%, 5) * S_z(\%) = 2,5706 * S_z(\%)$			0,85

Таблиця 7

## РОЗРАХУНОК ПАРАМЕТРІВ ПРОМІЖНОЇ ПРЕЦИЗІЙНОСТІ

№	Параметр	Аналітик №1	Аналітик №2
1		0,3956	0,3995
2		0,3973	0,3995
3		0,4052	0,3981
4		0,3957	0,4001
5		0,3956	0,4012
6		0,4046	0,3976
середнє		0,3990	0,3993
Дисперсія, $s^2$		2,2E-05	1,7E-06
Відносне стандартне відхилення, RSD		0,0538	
Довірчий інтервал, $\Delta_{intra} = t(95\%, m * n - 1) * RSD, \% = 2,201 * RSD, \%$		0,11841	
Критерій Стюдента (t-статистика)		-0,1541	
t критичне		1,8125	

Різниця дисперсій вибірок не повинна бути статистично значущим (перевірка за критерієм Стюдента). Розраховане тестове значення  $t (|t| = 0,1541)$  менше табличного значення критерію Стюдента  $t (p = 95 \%) (1,8125)$ , вибірки відносяться до однієї генеральної сукупності, критерій виконується.

#### ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ РОЗВІДОК

1. Проведено валідацію методики кількісного визначення діючої речовини тамсулозину гідрохлориду методом ВЕРХ у супозиторіях «Тамсу-

лопрост» для лікування гіперплазії передміхурової залози.

2. Визначені специфічність, лінійність, правильність, внутрішньолaboratorна прецизійність. Всі контрольовані валідаційні характеристики відповідають критеріям прийнятності і можуть бути використані для контролю розроблених супозиторіїв.

#### ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Валідація аналітичних методик і випробувань // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фар-

макопейний центр». – 1-е вид. – Х. : РІРЕГ, 2001. – Доп. 2. – 2008. – С. 85-100.

2. Простатопротекторы / С. М. Дроговоз, Т. А. Бухтиарова, В. В. Россихин и др. – Х: ООО ПП «Плеяда», 2005. – 184 с.

3. Розробка методики кількісного визначення діючої речовини в супозиторіях «Тамсулопрост» / В. І. Гриценко, О. А. Рубан, С. М. Губарь и др. // Вісник фармації. – 2014. – №3. – С. 42-46.

4. Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту // Державна Фармакопея України

/ Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». –1-е вид. – Х. : РІРЕГ, 2001. – Доповнення 1. – 2004. – С. 187-209.

5. Ярних Т. Г. Дослідження обігу простатопротекторів на вітчизняному фармацевтичному ринку / Т.Г. Ярних, К.В. Толочко // Вісник фармації. – 2008. – №4 (56). – С. 61-64.

6. The development of human benign prostatic hyperplasia with age / S. J. Barry, D. S. Coffey, P. C. Walsh, L. L. Ewin // J. Urol. – 2004. – Vol. 132. – P. 474-479.

### **УДК 615.25:615.454.2:54.061/062**

**В. І. Гриценко, О. А. Рубан, В. І. Гусаров, С. М. Губарь**

#### **ВАЛИДАЦІЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕЙСТВУЮЩЕГО ВЕЩЕСТВА ТАМСУЛОЗИНА ГИДРОХЛОРИДА В СУППОЗИТОРИЯХ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГИПЕРПЛАЗИИ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Проведена валидация предложенной ранее методики количественного определения действующего вещества тамсулозина гидрохлорида методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в суппозиториях «Тамсулопрост» для лечения гиперплазии предстательной железы. Определены специфичность, линейность, правильность и внутрилабораторная прецизионность методики.

Результаты проведенных исследований показали, что методика определения тамсулозина в суппозиториях методом ВЭЖХ удовлетворяет критериям приемлемости валидационных показателей.

**Ключевые слова:** валидация, суппозитории, тамсулозина гидрохлорид.

### **UDC 615.25:615.454.2:54.061/062**

**V. I. Grytsenko, O. A. Ruban, V. I. Gusarov, S. M. Gubar**

#### **VALIDATION OF THE METHODOLOGY FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE ACTIVE SUBSTANCE TAMSULOSIN HYDROCHLORIDE IN SUPPOSITORIES FOR THE TREATMENT OF PROSTATIC HYPERPLASIA**

Validation of the previously proposed methods for quantitative determination of the active ingredient Tamsulosin Hydrochloride has been conducted by high performance liquid chromatography (HPLC) in "Tamsuloprost" suppositories for the treatment of prostatic hyperplasia. Specificity, linearity, accuracy and intermediate precision of the technique have been determined.

The research results showed that the methodology of determination of Tamsulosin in suppositories by the HPLC method satisfies the eligibility criteria of validation standards.

**Key words:** validation, suppositories, Tamsulosin Hydrochloride.

*Адреса для листування:*

61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4

Кафедра заводської технології ліків НФаУ

(роб.): 0572- 67-88-52

моб.:+ 38-050-708-72-32

E-mail: vita.grytsenko@mail.ru

Надійшла до редакції:

19.06.2014