

УДК 615.453.6:615.322:001.891.5:54.062

Т. В. КРУТСЬКИХ, А. С. ШАЛАМАЙ<sup>1</sup>*Національний фармацевтичний університет, м. Харків*<sup>1</sup>*ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ», м. Київ*

## ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ СУМИ ЕЛАГОТАНІНІВ У ТАБЛЕТКАХ АЛЬТАБОР

*У статті наведено результати проведення валідації методики кількісного визначення суми елаготанінів у таблетках альтабор. Згідно отриманих даних встановлено, що вищезазначена методика може бути використана для визначення суми елаготанінів у тесті «Кількісне визначення» в таблетках Альтабор.*

**Ключові слова:** валідація, кількісне визначення, специфічність, правильність, точність.

### ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ

Усі аналітичні методики, які входять до монографії чи специфікації мають бути валідовані. Валідації аналітичних методик підлягають: випробування на ідентифікацію; кількісні випробування для визначення домішок; випробування на граничний вміст домішок; кількісні випробування для визначення діючої речовини та інших компонентів (наприклад консервантів) у лікарських субстанціях і готових препаратах; зокрема, сюди входять «Кількісне визначення», «Однорідність вмісту діючої речовини в одиниці дозованого ЛП» і «Розчинення» [4]. Методики аналізу і випробування, які вже включені в окремі статті ДФУ, вважаються валідованими. У разі, якщо до специфікації включається методика, яка не описана у ДФУ, необхідне проведення валідації у повному обсязі.

### АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

Якщо методика описана у ДФУ, то вимоги до її валідації при включенні до специфікації визначають по-різному. Для субстанцій: за наявності у виробника субстанції сертифіката відповідності монографії Європейської фармакопеї (ЄФ) валідація не потрібна. Якщо такий сертифікат відсутній, необхідно продемонструвати, що всі домішки (супутні домішки і залишкові кількості органічних розчинників) контролюються монографією ЄФ. Якщо це не так, то слід ввести додаткові випробування з відповідною

валідацією. Для готових лікарських препаратів валідацію аналітичних методик проводять в обмеженому обсязі, в її результаті необхідно продемонструвати, що для даного складу препарату і упаковки методики специфікації дають коректні результати. Замість фармакопейних методик можуть використовувати альтернативні методики за умови, що вони дають еквівалентні результати. Для таких методик необхідна валідація у повному обсязі. Обсяг валідаційних досліджень залежить від специфіки методу аналізу і конкретної методики. Якщо для фармакопейної методики немає необхідності у валідації, потрібно провести лише верифікацію методики, тобто експериментальне підтвердження того, що методика може бути коректно відтворена в лабораторному оточенні.

Набір досліджуваних валідаційних характеристик залежить від призначення аналітичної методики. Типові валідаційні характеристики: правильність, точність, збіжність, внутрішньолaboratorна точність, специфічність, межа виявлення, межа кількісного визначення, лінійність, діапазон застосування. Цей перелік треба розглядати як типовий для зазначених випробувань (аналітичних методик). Як правило, на стадії розробки методики вивчається також така валідаційна характеристика як робасність [1, 6].

### ВИДІЛЕННЯ НЕВИРШЕНИХ РАНІШЕ ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ

Валідація аналітичних методик — невід’ємна частина Належної виробничої практики (GMP), яка гарантує, що вибрана методика буде давати

відтворювані та достовірні результати відповідно до поставлених цілей.

Надання даних з валідації аналітичних методик при реєстрації лікарських засобів або для монографій фармакопей передбачено спеціальними директивами ЄС та документами ВООЗ [8]. У нашій країні, де також для виробництва лікарських препаратів діють вимоги Належної виробничої практики, проведення валідації є також необхідним заходом постановки лікарського засобу на виробництво [3, 7].

#### ФОРМУЛЮВАННЯ ЦІЛЕЙ СТАТТІ

Метою наших досліджень стало проведення валідації методики кількісного визначення суми елаготанінів в таблетках Альтабор.

#### ВИКЛАД ОСНОВНОГО МАТЕРІАЛУ ДОСЛІДЖЕННЯ

Виходячи з хімічної будови субстанції альтабор, кількісне визначення елаготанінів пропонується проводити в перерахунку на танінову кислоту, яка є складним ефіром, структурні елементи котрої аналогічні альтабору. Для визначення кількості діючих речовин нами було застосовано метод абсорбційної спектрофотометрії [2]. Для проведення кількісного визначення альтабору 20 таблеток розтирали у фарфоровій ступці та ретельно перемішували.

Випробовуваний розчин (а) готували наступним чином. Близько 0,50 г (точна наважка) порошку розтертих таблеток поміщали у мірну колбу місткістю 100 мл, додавали 30 мл води, перемішували на магнітній мішалці упродовж 15 хв, доводили об'єм розчину водою до позначки і перемішували. Давали розчину відстоятися упродовж 10 хв, потім декантували 30-40 мл розчину, позбавляючись гідрофобних речовин, що збираються у верхній частині колби. Частину залишку центрифугували за частоти обертання 9000 об/хв упродовж 25 хв. Для подальших досліджень використовували надосадовий розчин.

Випробовуваний розчин (b) готували так: 4,0 мл випробовуваного розчину (а) поміщали у мірну колбу місткістю 25 мл, додавали 5,0 мл буферного розчину та 1,0 мл розчину реагенту, доводили об'єм розчину до позначки водою, перемішували. Колбу закривали пробкою і нагрівали на водяній бані за температури від 77 до 82 °С упродовж 40 хв. Потім мірну колбу охолоджували під струменем холодної води до кімнатної температури, перемішували.

Розчин порівняння готували наступним чином. Близько 50,0 мг танінової кислоти, висушеної до постійної маси за температури від 100 до 105 °С, поміщали у мірну колбу місткістю 200 мл,

розчиняли в 50 мл води. Доводили об'єм розчину тим самим розчинником до позначки, перемішували. У мірну колбу місткістю 25 мл поміщали 3,0 мл одержаного розчину, додавали 5,0 мл буферу та 1,0 мл розчину реагенту, доводили об'єм розчину до позначки водою, перемішували. Колбу закривали пробкою і нагрівали на водяній бані за температури від 77 до 82 °С упродовж 40 хв. Потім мірну колбу охолоджували під струменем холодної води до кімнатної температури, перемішували.

Приготування випробовуваного розчину (b) та розчину порівняння проводили в однаковому температурному режимі та часі, строго дотримуючись зазначеної послідовності додавання буферного розчину та розчину реагенту.

Вимірювали оптичну густину випробовуваного розчину (b) та розчину порівняння за 550 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи воду як компенсаційний розчин.

Вміст суми елаготанінів (X) у таблетці, у перерахунку на танінову кислоту і середню масу таблетки, у міліграмах, обчислювали за формулою:

$$X = \frac{A_1 \cdot m_o \cdot 3 \cdot P \cdot 100 \cdot 25 \cdot b}{A_o \cdot 1000 \cdot 200 \cdot 25 \cdot 100 \cdot m_1 \cdot 4} = \frac{A_1 \cdot m_o \cdot P \cdot 0,00000375 \cdot b}{A_o \cdot m_1},$$

де:  $A_1$  – оптична густина випробовуваного розчину (b);

$A_o$  – оптична густина розчину порівняння;

$m_o$  – маса наважки танінової кислоти, мг;

$m_1$  – маса наважки порошку розтертих таблеток, г;

P – вміст танінової кислоти вказаний у сертифікаті танінової кислоти, %;

b – середня маса таблетки, мг.

Вміст суми елаготанінів в одній таблетці, у перерахунку на танінову кислоту і середню масу таблетки, має бути від 18,0 до 22,0 мг ( $\pm 10\%$ ). Нормування вмісту активної речовини дещо більше рекомендованого ДФУ, ст. «Таблетки», оскільки сухий екстракт Альтабор – це суміш речовин рослинного походження.

Для перевірки придатності методики кількісного визначення суми елаготанінів спектрофотометричним методом, яка входить до складу Специфікації якості на таблетки Альтабор, нами проведено валідацію методики, основними розділами якої є специфічність, правильність та точність [5].

Специфічність методики доводили за порівнянням спектральних характеристик: положення максимумів спектральних кривих та значенням оптичних густин за довжини хвилі 550 нм для розчину порівняння з концентрацією танінової кислоти 0,030 мг/мл та випробовуваного розчину з концентрацією суми елаготанінів, у

перерахунку на танінову кислоту, 0,032 мг/мл. Спектри поглинання розчину танінової кислоти та випробуваного розчину мають максимум поглинання за довжини хвилі 555,49 та 558,30 нм,

відповідно. Оптичні густини розчину порівняння та випробуваного розчину за довжини хвилі 550 нм та за однакової концентрації (0,4034; 0,4035 відповідно) близькі (рис. 1 – 3).

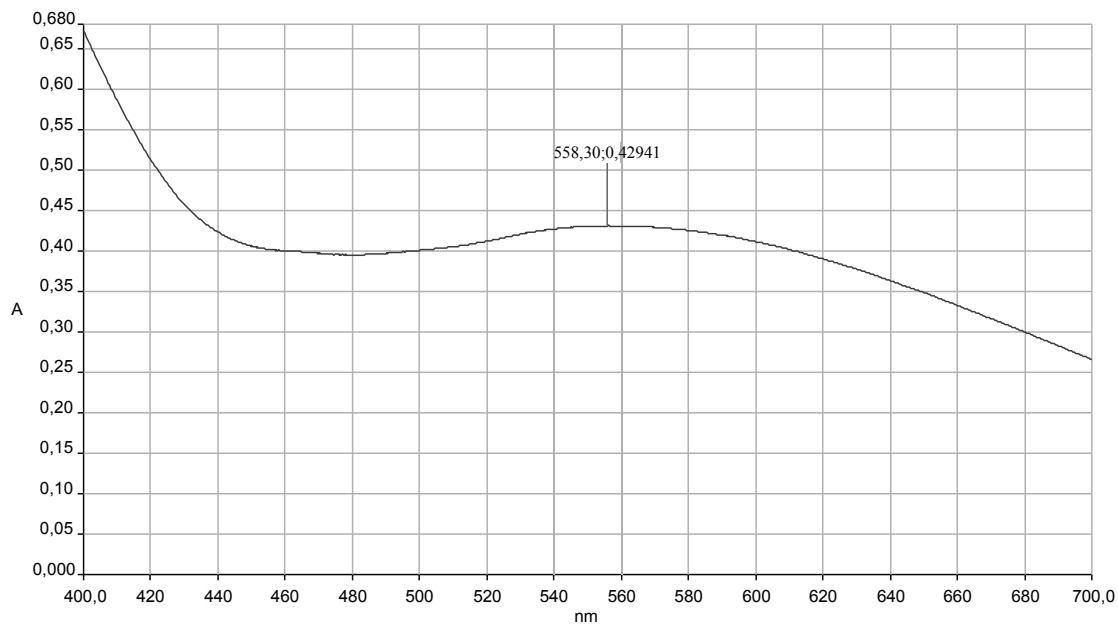


Рис. 1. Спектр випробуваного розчину

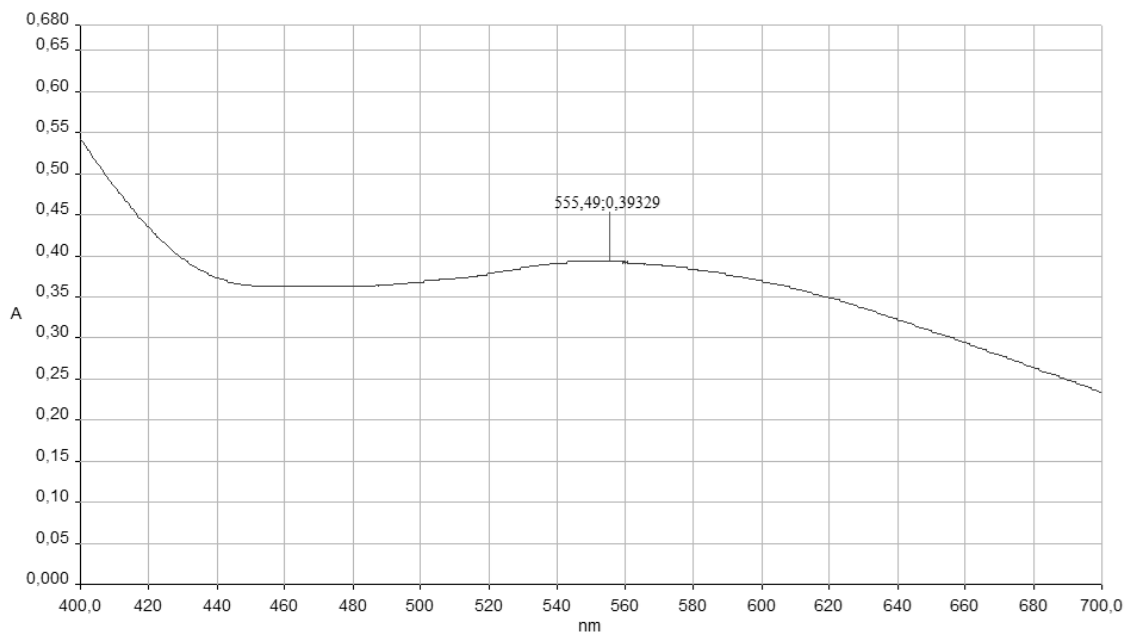


Рис. 2. Спектр розчину порівняння

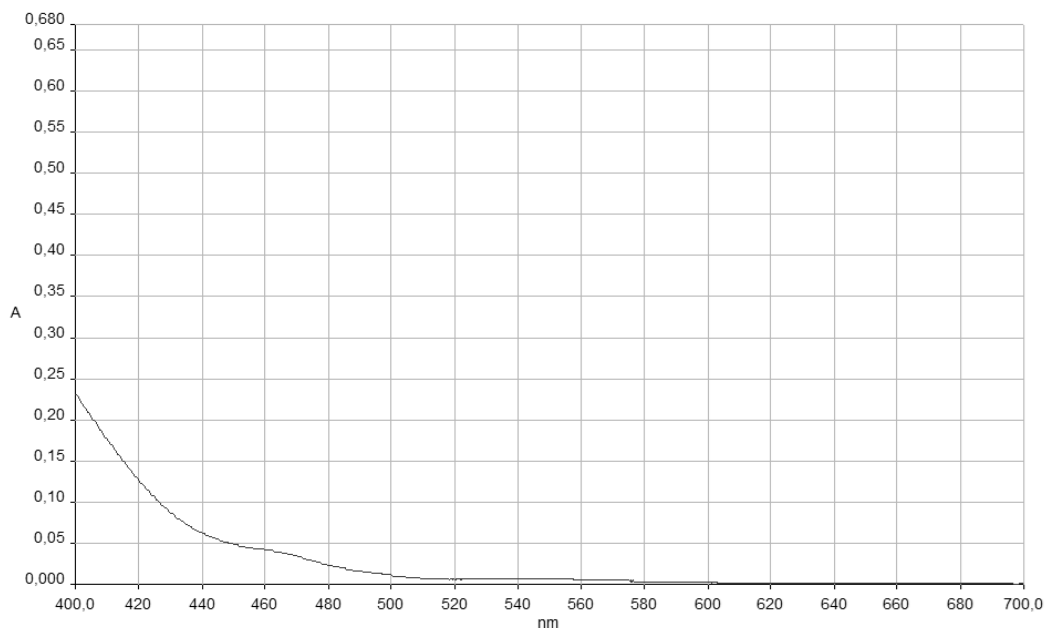


Рис. 3. Спектр холостого розчину

Оптична густина розчину плацебо (середнє значення) — 0,0028, що складає 0,69 % від робочої оптичної густини. Критичне значення — 1,0 %. Внесок плацебо незначимий. Таким чином, можна зробити висновок, що специфічність методики достатня.

Правильність методики перевіряли шляхом додавання до плацебо відомої кількості субстанції Альтабор. Правильність методики оцінювали як відношення введено/знайдено для концентрацій 80, 100 та 120 % (n=9). Отримані результати наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

**СТАТИСТИЧНА ОБРОБКА РЕЗУЛЬТАТІВ ПРАВИЛЬНОСТІ**

Вміст суми елаготанінів, %	Знайдено / введено, %	$\bar{X}\%$	RSD, %	$\delta$ , %
80	100,01 100,10 99,98	99,82	0,32	0,18
100	99,85 99,62 100,01			
120	99,34 99,31 100,17			
Критичні значення			2,78	1,0
Оцінка: відповідає/ не відповідає			відповідає	відповідає

Одержані дані та розрахунки підтверджують, що методика систематичною похибкою не обтяжена, правильність достатня.

Точність. При оцінюванні точності враховували збіжність результатів аналізу. Результати оцінки точності наведено в таблиці 2.

Таблиця 2

**СТАТИСТИЧНА ОБРОБКА РЕЗУЛЬТАТІВ ТОЧНОСТІ**

X, мг/табл	$X_{\text{сер}}$ , мг/табл	S, мг/табл	$S_r$ , %	v	P, %	t (P,v)	$X_i \pm \Delta x$ мг/табл
19,21 19,11 19,29 19,24 18,97 18,94	19,13	0,15	0,76	5	95	2,571	0,37
Критичні значення			1,24				0,64

Одержані розрахунки підтверджують, що збіжність результатів аналізу достатня.

**ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ РОЗВІДОК**

На підставі одержаних даних та розрахунків можна зробити висновок, що вищезазначена методика може бути використана для визначення суми елаготанінів в тесті «Кількісне визначення» в таблетках Альтабор.

**ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ**

- Гризодуб А. И. Стандартные процедуры валидации методик контроля качества лекар-

- ственных средств / А. И. Гризодуб // Фармаком. – 2006. – № 1/2. – С. 35–44.
2. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х. : РІРЕГ, 2001. – 556 с.
  3. Методичні рекомендації «Організація валідаційної діяльності на підприємствах з виробництва лікарських засобів» / С. М. Коваленко, О. С. Соловійов, Н. О. Тахтаулова [та ін.]. — К. : МОЗ України, 2012.
  4. Методичні рекомендації «Організація валідаційної діяльності на підприємствах з виробництва лікарських засобів» / С. М. Коваленко, О. С. Соловійов, Н. О. Тахтаулова [та ін.]. — К. : МОЗ України, 2012.
  5. Надлежащая производственная практика лекарственных средств. Активные фармацевтические ингредиенты. Готовые лекарственные средства. Руководство по качеству. Рекомендации РИС/S / под ред. Н. А. Ляпунова, В. А. Загория, В. П. Георгиевского, Е. П. Безуглой. — К. : Морион, 2001. — 472 с.
  6. Настанова «Лікарські засоби. Фармацевтична розробка» (42–3.1:2004). — К.: Морион. — 2004. — 15 с.
  7. Настанова «Лікарські засоби. Належна виробнича практика (42–4.0:2014). — К.: МОЗ України, 2014, — 301 с.
  8. Фармацевтический сектор: основы современного законодательства в Европейском Союзе / Авторы-составители: Н. А. Ляпунов, В. А. Усенко, А. Л. Спасокукоцкий, Е. П. Безуглая / Научные консультанты: В. П. Георгиевский, В. Т. Варченко, В. Л. Багирова. — К. : Морион, 2002.

### УДК 615.453.6:615.322:001.891.5:54.062

Т. В. Крутських, А. С. Шаламай

#### ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ЭЛАГОТАНИНОВ В ТАБЛЕТКАХ АЛЬТАБОР

В статье представлены результаты проведения валидации методики количественного определения суммы элаготанинов в таблетках альтабор. На основании полученных результатов установлено, что вышеуказанная методика может быть использована для определения суммы элаготанинов в тесте «Количественное определение» в таблетках альтабор.

**Ключевые слова:** валидация, количественное определение, специфичность, правильность, точность.

### UDC 615.453.6:615.322:001.891.5:54.062

T. V. Krutskikh, A. S. Shalamay

#### VALIDATION OF THE METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE AMOUNT ELAGOTANNINS IN TABLETS ALTABOR

The article presents the results of the validation of the method of quantitative determination of the amount of elagotannins in tablets altabor. The obtained results showed that the above procedure can be used to determine the amount of elagotannins in the test «Quantitative determination» in tablets altabor.

**Key words:** validation, quantitative determination, specificity, accuracy, precision.

Адреса для листування:

61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4,  
Кафедра управління якістю НФаУ.  
Тел. +38 (057) 68-56-71

Надійшла до редакції:

14.02.2015 р.