

УДК 543+615.07

## **ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ПРЕПАРАТАХ**

**О.И. Юрченко, А.В. Осипов, М.А. Добрян, Т.В. Черножук**

Подобраны оптимальный объём и концентрация хлороводородной кислоты для приготовления раствора никотиновой кислоты. Исследованы основные метрологические характеристики спектрофотометрической методики – линейность, правильность, прецизионность, внутрилабораторная прецизионность, специфичность, а также показано, что данная методика может применяться для количественного определения никотиновой кислоты в инъекционном препарате «Никотиновая кислота – Здоровье» с допуском содержания действующего вещества  $\pm 5\%$ . Методика позволяет надёжно получать воспроизводимые результаты.

**Ключевые слова:** методика, линейность, правильность, прецизионность, внутрилабораторная прецизионность, специфичность.

### **Введение**

Способы фармацевтического анализа нуждаются в систематическом совершенствовании в связи с непрерывным повышением требований к качеству лекарственных средств, причем требования растут как к степени чистоты лекарственных веществ, так и к методам их количественного определения. В настоящее время фармацевтические предприятия Украины стремятся привести существующие производственные процессы в соответствие к международным стандартам надлежащей производственной практики (GMP). Данные стандарты предъявляют высокие требования к обеспечению качества лекарственных средств при их разработке, производстве и контроле.

Инъекционный препарат никотиновой кислоты является известным противопеллагрическим средством, применяющимся для восполнения дефицита никотиновой кислоты в организме.

Для определения содержания никотиновой кислоты существует методика, описанная в Государственной Фармакопее Украины (ГФУ), которая предусматривает титрование никотиновой кислоты раствором NaOH [1]. Методика количественного спектрофотометрического определения содержания никотиновой кислоты в ГФУ и Европейской Фармакопее отсутствует. В соответствии с требованиями GMP относительно валидации аналитических методик, в том случае, если используемые методики контроля качества лекарственных препаратов не включены в Государственную Фармакопею Украины, Европейскую Фармакопею или в другую соответствующую Фармакопею, они должны пройти валидацию [2]. Требования относительно валидации методик и используемого оборудования также предложены в директивах, касающихся надлежащей лабораторной практики, принятых Европейским парламентом в 2004 году [3,4]. Валидацию методик следует проводить с учетом характеристик, приведенных в международных директивах, а также Государственной Фармакопее Украины. Объем аналитической валидации должен зависеть от типа аналитической методики [2].

Валидация аналитических методик - это неотъемлемая часть системы обеспечения качества, которая предусматривает документированное доказательство того, что данная аналитическая методика позволяет постоянно и надёжно получать результат, соответствующий требованиям спецификации. В ходе валидации необходимым является установление всех возможных источников погрешностей [1, 5-8].

Цель данной работы – модернизация и валидация методики спектрофотометрического определения содержания никотиновой кислоты в инъекционных препаратах.

### **Экспериментальная часть**

Раствор стандартного образца никотиновой кислоты готовился следующим образом. Навеску фармакопейного стандартного образца никотиновой кислоты, высушенной при температуре от 100°C до 105°C количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100.0 мл, раство-

ражи в 50 мл 0.1 моль/л раствора хлороводородной кислоты, довели объем раствора 0.1 моль/л раствором хлороводородной кислоты до метки и перемешивали. Затем 1.0 мл полученного раствора количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100.0 мл, довели объем раствора 0.1 моль/л раствором хлороводородной кислоты до метки и перемешивали.

Модельные растворы никотиновой кислоты готовились следующим образом. Готовили исходный модельный раствор: 10.0 мг никотиновой кислоты, высушенной при температуре от 100°C до 105°C до постоянной массы, количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100.0 мл, растворяли в 50 мл 0.1 моль/л раствора хлороводородной кислоты, довели объем раствора 0.1 моль/л раствором хлороводородной кислоты до метки и перемешивали. Далее готовили серию модельных растворов с содержанием никотиновой кислоты от 80 до 120% от номинального. В колбу вместимостью 100 мл помещали соответствующие количества исходного модельного раствора (8.0; 8.5; 9.0; 9.5; 10.0; 10.5; 11.0; 11.5 и 12.0 мл), довели до метки 0.1 моль/л раствором хлороводородной кислоты с последующим перемешиванием.

Для исследования внутрилабораторной прецизионности на следующий день повторили измерение светопоглощения приготовленного модельного раствора со 100% содержанием никотиновой кислоты на другом спектрофотометре, всего было проведено по пять измерений светопоглощения в день в соответствии с рекомендациями [5].

1 мл каждого из полученных растворов переносили в мерную колбу вместимостью 100.0 мл, довели объем раствора 0.1 моль/л раствором хлороводородной кислоты до метки и перемешивали. 10.0 мл полученного раствора количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100.0 мл, довели объем раствора 0.1 моль/л раствором хлороводородной кислоты до метки и перемешивали.

Измерение светопоглощения исследуемого раствора проводили при длине волны 261 нм на спектрометрах Thermo Fisher Scientific Evolution 60 (сертификат поверки №402/4 сроком действия до 01.12.2014), диапазон измеряемых длин волн от 190–1100 нм, длина кюветы 10 мм, и Thermo Scientific Evolution 60S (сертификат поверки №402/5 сроком действия до 01.12.2014), диапазон измеряемых длин волн от 190–1100 нм, длина кюветы 10 мм, используя в качестве раствора сравнения 0.1 моль/л раствор хлороводородной кислоты.

Математическая обработка результатов и расчет валидационных характеристик проводились в соответствии с рекомендациями ГФУ [6] с использованием программы Microsoft Excel.

Расчет полной неопределенности результатов анализа. Полную неопределенность результатов анализа рассчитывали как корень из суммы квадратов неопределенности пробоподготовки и неопределенности конечной аналитической операции. Критерием приемлемости, согласно ГФУ, для методики количественного определения с допуском содержания никотиновой кислоты 5% для полученной неопределенности является:

$$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 0.32 \cdot 5\% = 1.60\%$$

В табл. 1 указаны значения неопределенности для каждого из этапов пробоподготовки и рассчитана общая неопределенность пробоподготовки.

**Таблица 1.** Расчет неопределенности пробоподготовки

Операция пробоподготовки	Значение неопределенности
Приготовление раствора стандартного образца	
1. Взятие навески никотиновой кислоты	0.20 мг/100.0 мг · 100% = 0.20 %
2. Доведение до объема в мерной колбе вместимостью 100 мл	0.12%
3. Взятие аликвоты пипеткой 1 мл	0.60%
4. Доведение до объема в мерной колбе вместимостью 100 мл	0.12%
Приготовление испытуемого раствора	
1. Взятие аликвоты пипеткой 1 мл	0.60%
2. Доведение до объема в мерной колбе вместимостью 100 мл	0.12%
3. Взятие аликвоты пипеткой 10 мл	0.50%
4. Доведение до объема в мерной колбе вместимостью 100 мл	0.12%
$\Delta_{SP} = 1.03\%$	

При прогнозе  $\Delta_{FAO}$  использовали величину  $RSD_A$  с рандомизацией положения кювет, полученную в межлабораторном эксперименте ( $RSD_A = 0.52\%$ ) [9].

$$\Delta_{FAO} = \sqrt{2} \cdot \frac{0.52 \cdot 1.645}{\sqrt{3}} = 0.70\%$$

где:  $\Delta_{FAO}$  – неопределённость конечной аналитической реакции;  $RSD_A$  – относительное стандартное отклонение.

Полная неопределенность исследуемой аналитической методики  $\Delta_{As}$  равна:

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2} = \sqrt{1.03^2 + 0.70^2} = 1.25\% < 1.60\%$$

где:  $\Delta_{As}$  – погрешность пробоподготовки.

Данная величина  $\Delta_{As}$  удовлетворяет требованиям ГФУ к полной неопределенности результатов анализа.

Проверка правильности методики. Критерием правильности методики является статистическая незначимость величины  $\delta\% = |Z_{cp} - 100|$ :

$$\delta\% \leq \Delta_{Z_{cp}} = \frac{\Delta_{As}}{\sqrt{n}} = \frac{t_{n-1}^{0.95} \cdot s_z}{\sqrt{n}}, \text{ т.е.}$$

$$0.13\% \leq \frac{1.8595 \cdot 0.360}{\sqrt{9}} = 0.22\%$$

Полученный результат показывает, что методика удовлетворяет требованиям, предъявляемым к правильности.

Проверка прецизионности методики. Согласно требованиям ГФУ к прецизионности аналитической методики, односторонний доверительный интервал  $\Delta_Z$  не должен превышать максимально допустимую неопределенность результатов анализа ( $\Delta_{As}$ ):

$$\Delta_Z = s_z (\%) \cdot t_{n-1}^{0.95} \leq \max \Delta_{As}.$$

Для полученных спектрофотометрических данных эти требования выдерживаются:

$$\Delta_Z = 0.67\% \leq 1.60\%$$

**Таблица 2.** Результаты валидационных испытаний

Испытание	Критерий	Результат	Вывод
Контроль полной неопределенности результатов анализа	$\max \Delta_{As} \leq 1.60\%$	$\Delta_{As} = 1.25\%$	соответствует
Контроль линейности методики	$\min r = 0.9981$ $ a  \leq 1.33$ $s_0/b \leq 0.85$	$r = 0.9994$ $ a  = 0.05$ $s_0/b \leq 0.35$	соответствует
Контроль правильности методики	$\delta \leq 0.22\%$	$\delta = 0.13\%$	соответствует
Контроль прецизионности	$\Delta_Z \leq 1.60\%$	$\Delta_Z = 0.67\%$	соответствует
Контроль внутрилабораторной прецизионности методики	$\Delta_{intra} \leq 1.60\%$	$\Delta_{intra} = 0.11\%$	соответствует
Контроль специфичности методики	$\max \delta_{blank} = 0.16\%$	$\delta_{blank} = 0.16\%$	соответствует

Исследование специфичности методики. В ходе исследования специфичности методики определялся вклад вспомогательных веществ, входящих в состав препарата в общее поглощение раствора. Было измерено светопоглощение раствора плацебо  $A_{blank} = 0.001$ , а также светопоглощение раствора с номинальной концентрацией никотиновой кислоты  $A_{st} = 0.435$ . Вклад плацебо в суммарное поглощение составил:

$$\delta_{blank} = \frac{0.001}{0.435} \cdot 100\% = 0.16\%$$

Данный вклад является незначимым, так как он является меньшим, чем

$$\max \delta = 0.32 \cdot 0.32 \cdot \Delta_{As} = 0.10 \cdot 1.60 = 0.16.$$

Данная методика обладает достаточной специфичностью.

Результаты валидационных испытаний. В табл. 2 указаны исследованные валидационные характеристики, критерии и результаты испытаний.

Путем варьирования массы навески пробы от 0.5 до 1.0 г и применения метода стандартных добавок установлено, что полученные результаты не содержат значимых систематических погрешностей.

### Выводы

Подобраны оптимальный объём (50 мл) и концентрация (0.1 моль/л) хлороводородной кислоты при приготовлении раствора. Показано, что данная методика может применяться для количественного определения никотиновой кислоты в инъекционном препарате «Никотиновая кислота-Здоровье» с допуском содержания действующего вещества  $\pm 5\%$ . Методика позволяет надёжно получать воспроизводимые результаты.

### Литература

1. Державна Фармакопея України – 1-е вид. – Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр».– Харків: PIPEГ. 2001. – 556 с.
2. Лікарські засоби. Належна виробнича практика: СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2011. – [Чинний від 2011-06-07] – К.: Міністерство охорони здоров'я України, 2011. – 268 с.
3. Directive 2004/9/EC of the European Parliament and of the Council of 11 February 2004 on the inspection and verification of good laboratory practice (GLP) / Official Journal of the European Union. – 2004. – Vol. 50. – P. 28-43.
4. Directive 2004/10/EC of the European Parliament and of the Council of 11 February 2004 on the inspection and verification of good laboratory practice (GLP) / Official Journal of the European Union. – 2004. – Vol. 50. – P. 44-59
5. Стандартизована процедура валидації методик кількісного аналізу лікарських засобів методом стандарту / А.І. Гризодуб, Д.А. Леонт'єв, Н.В. Денисенко, Ю.В. Подпружников // Фармаком. – 2004. – №3. – С. 3-16.
6. Державна Фармакопея України – 1-е вид. Доповнення 2.– Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр».– Харків: PIPEГ.– 2008. – 620 с.
7. Brown R. Analytical Procedures and Method Validation: Highlights of the FDA's Draft Guidance / R. Brown, M. Caphart, P. Faustino et al. // LCGC. – 2001. – Vol. 19, № 1.– P. 74-79.
8. Hiremath B., Mruthyunjayaswamy B.H.M. Development and validation of spectrophotometric methods for determination of ceftazidime in pharmaceutical dosage forms / B. Hiremath, B.H.M. Mruthyunjayaswamy // Acta Pharm.– 2008. – № 58. – P. 275-285.
9. Гризодуб А.И. Воспроизводимость фармакопейных спектрофотометрических методик количественного определения лекарственных средств в разных лабораториях / А.И. Гризодуб, Н. Н. Зволинская, Д.А. Леонт'єв и др // Фармаком. – 2004. – №2. – С. 1-16.

### References

1. Derjavna Farmakopeya Ukraїni - 1-e vid. - Derjavne pi'dprie"mstvo «Naukovo-ekspertnij farmakopeynij centr».- Harki'v: RI'REG. 2001. - 556 s.
2. Li'kars'ki' zasobi. Nalejna virobniča praktika: ST-N MOZU 42-4.0:2011. - [CHinniy vi'd 2011-06-07] - K.: Mi'ni'sterstvo ohoroni zdorov'ya Ukraїni, 2011. - 268 s.
3. Directive 2004/9/ES of the European Parliament and of the Council of 11 February 2004 on the inspection and verification of good laboratory practice (GLP) / Official Journal of the European Union. - 2004. - Vol. 50. - P. 28-43.
4. Directive 2004/10/EC of the European Parliament and of the Council of 11 February 2004 on the inspection and verification of good laboratory practice (GLP) / Official Journal of the European Union. - 2004. - Vol. 50. - P. 44-59
5. Standartizovannaya procedura validacii metodik kolichestvennogo analiza lekarstvenny'h sredstv metodom standarta / A.I. Grizodub, D.A. Leont'ev, N.V. Denisenko, YU.V. Podprujnikov // Farmakom. - 2004. - №3. - S. 3-16.
6. Derjavna Farmakopeya Ukraїni - 1-e vid. Dopovnennya 2.- Derjavne pi'dprie"mstvo «Naukovo-ekspertnij farmakopeynij centr».- Harki'v: RI'REG.- 2008. - 620 s.

7. Brown R., Analytical Procedures and Method Validation: Highlights of the FDA's Draft Guidance / R. Brown, M. Caphart, P. Faustino et al. // LCGC. - 2001. - Vol. 19, № 1.- P. 74-79.
8. Hiremath B. Development and validation of spectrophotometric methods for determination of ceftazidime in pharmaceutical dosage forms / B. Hiremath, B.H.M. Mruthyunjayaswamy // Acta Pharm.– 2008. – № 58. – P. 275-285
9. Hryzodub A.Y. Vosproyzyvodymost' farmakopeynykh spektrofotometrycheskykh metodyk kolychestvennoho opredelenyya lekarstvennykh sredstv v raznykh laboratoryyakh / A.Y. Hryzodub, N. N. Zvolynskaya, D.A. Leont'ev y dr. // Farmakom. – 2004. – #2. – С. 1-16.

*Поступила в редакцию 4 сентября 2014 г.*

О.І. Юрченко, А.В. Осипов, М.О. Добрян, Т.В. Черножук. Валідація методики спектрофотометричного визначення нікотинної кислоти в препаратах.

Підібрані оптимальний об'єм та концентрація хлороводневої кислоти для приготування розчину нікотинної кислоти. Досліджено основні метрологічні характеристики спектрофотометричної методики – лінійність, правильність, прецизійність, внутрішньолaboratorна прецизійність, специфічність, а також показано, що дана методика може використовуватись для кількісного визначення нікотинної кислоти в ін'єкційному препараті «Нікотинна кислота – Здоров'я» з допуском вмісту діючої речовини  $\pm 5\%$ . Методика дозволяє надійно отримувати відтворювані результати.

**Ключові слова:** методика, лінійність, прецизійність, внутрішньолaboratorна прецизійність, специфічність.

O.I. Yurchenko, A.V. Osipov, M.O. Dobriyan, T.V. Chernozhuk. Validation of the method of spectrophotometric determination of nicotinic acid in preparations.

The optimum volume and concentration of hydrochloric acid is determined to prepare the solution of nicotinic acid. The main metrological characteristics of the spectrophotometric method are studied, namely, linearity, accuracy, precision, internal laboratory precision, specificity, and it is shown that this method can be used for the quantitative determination of nicotinic acid in Injectables "Nicotinic acid - Health" with  $\pm 5\%$  tolerance of active ingredient content. The method ensures reproducible results.

**Key words:** method, linearity, precision, internal laboratory precision, specificity.

Kharkov University Bulletin. 2014. № 1136. Chemical Series. Issue 24 (47).