

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОФІЛІВ РОЗЧИНЕННЯ ТАБЛЕТОК ВАЛАЦИКЛОВІРУ ГІДРОХЛОРИДУ

© С. М. Гурєєва, Ю. А. Кондратова, А. В. Зайдзе, О. М. Яковенко, А. М. Стельмах

Відкрите акціонерне товариство «Фармак»

Резюме: розроблено ВЕРХ-методику кількісного визначення валацикловіру гідрохлориду для дослідження профілів вивільнення діючої речовини з таблеток валацикловіру гідрохлориду по 500 мг, вкритих оболонкою, отриманих методом вологої грануляції. Досліджено валідаційні характеристики розробленої методики, встановлено, що вона є придатна для визначення вивільнення валацикловіру гідрохлориду з ГЛФ.

Ключові слова: профілі вивільнення, валідація, високоефективна рідинна хроматографія, кількісне визначення, валацикловіру гідрохлорид.

Вступ. Головним завданням вітчизняного фармацевтичного виробника є створення сучасних ефективних, безпечних та доступних ліків з відповідною оригінальним препаратам біоеквівалентністю.

При розробці твердих лікарських форм велике значення надається вивченню ступеня вивільнення діючих речовин у часі в середовищах з різним показником кислотності (рН). Дані таких досліджень використовуються як для вибору остаточного складу препарату, так і в подальшому, зокрема, при вивченні біоеквівалентності. Фармако-технологічний тест «Розчинення» – основа вивчення біоеквівалентності препарату *in vitro*. Цей тест використовується для підтвердження якості препарату в рутинному аналізі, але може й відрізнитися обраним середовищем. Наприклад, з економічної та ергономічної точки зору як середовище розчинення зручно використовувати воду Р. Вибір середовища для вивчення кінетики вивільнення діючої речовини має бути обґрунтованим: враховувати фізико-хімічні властивості АФІ та моделювати рН відповідно до рН різних відділів ШКТ людини.

Вивчення біоеквівалентності є працемістким дослідженням, яке вимагає проведення специфічних клінічних досліджень та аналізу численних зразків високочутливими методами (хромато-мас-спектрометрія, тандемна мас-спектрометрія інші) з високою вартістю досліджень. Тому попередньо проводяться численні дослідження *in vitro*. Відповідність кінетики вивільнення діючої речовини розроблених препаратів оригінальним препаратам може, з певною імовірністю, прогнозувати аналогічну кінетику в експерименті *in vivo*.

Аналітична методика для дослідження вивільнення діючої речовини повинна враховувати

природу АФІ і природу плацебо оригінального та відтвореного препарату, бути селективною, зручною, експресною.

Мета роботи – розробка та валідація ВЕРХ-методики кількісного визначення валацикловіру гідрохлориду при дослідженні кінетики його вивільнення з ГЛФ.

Методи дослідження. Проведений літературний пошук показав, що на момент розробки препарату ні валацикловіру гідрохлорид, ні препарат на його основі у Фармакопеях та інших наукових джерелах не були описані [5]. При розробці аналітичної методики було проведено оцінку розчинності субстанції в широкому діапазоні буферних розчинів відповідно біофармацевтичної кваліфікаційної системи. Встановлено, що субстанція валацикловіру гідрохлориду належить до речовин з високою розчинністю. Також було встановлено, що у буферних розчинах зі значенням рН близьким до нейтрального, зокрема 6.8, відбувається розклад валацикловіру гідрохлориду. Оскільки цей процес є не прогнозованим, то дослідження профілів розчинення в таких середовищах проводити недоцільно.

При виборі методу визначення було вирішено використовувати метод рідинної хроматографії з спектрофотометричним детектором як найбільш селективний серед доступних методів, оскільки поведінка плацебо оригінального препарату невідома.

Досліджуючи різні хроматографічні системи, було встановлено, що вимоги придатності хроматографічної системи виконуються при застосуванні хроматографічної колонки Hypersil BDS C18 250×4,6 мм з розміром часток 5 мкм (виробник Thermo Scientific) і рухомої фази – суміші 2,72 г/л калію дигідрофосфату Р (буферний роз-

чин з рН = 4,7) і метанолу у співвідношенні від 80 % до 20 % (градієнтне елюювання). Запропонована хроматографічна система забезпечувала експресність аналізу та необхідні харак-

теристики придатності хроматографічної системи при тривалому використанні. Час утримування валацикловіру гідрохлориду за таких умов складає близько 4 хв (рис. 1).

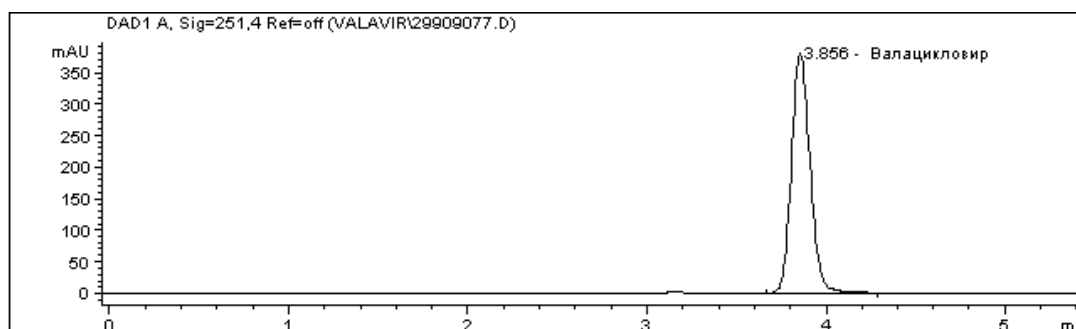


Рис. 1. Типова хроматограма випробовуваного розчину.

Вміст валацикловіру гідрохлориду, що перейшов у розчин, у відсотках, розраховували з урахуванням коефіцієнта перерахунку валацикловіру гідрохлориду на валацикловір (0,8988), та урахуванням вмісту води у робочому стандартному зразку, оскільки ця речовина є дуже гігроскопічною, що може значно вплинути на кінцевий результат. Згідно з одержаними даними будували графік залежності кількості вивільненого з таблетки валацикловіру гідрохлориду (%) від часу (хв).

Наступним кроком дослідження було проведення валідації запропонованої методики згідно з вимогами Державної фармакопеї України (монографія «Валідація аналітичних методик і випробувань») [1].

В умовах методики було вивчені наступні валідаційні характеристики: специфічність, діапазон застосування, лінійність, точність і правильність.

Результати й обговорення. Вивчення профілів розчинення референтного та дослідного препарату проводять у трьох середовищах з різним показником кислотності. Характер розчинення твердого лікарського засобу в середовищах з різним рН залежить від складу препарату та фізико-хімічних властивостей діючої і допоміжних речовин.

Як було зазначено, валацикловіру гідрохлорид є нестійким у середовищі з рН 6,8, тому профілі розчинення вивчали у двох, рекомендованих ДФУ, середовищах з рН = 1,2 і рН = 4,5.

При валідації методики «Кінетика розчинення» перед дослідником постає два завдання: визначення діапазону застосування методики для кожного середовища і обґрунтування критеріїв для порівняння отриманих валідаційних даних. Зазвичай необхідний діапазон значно ширший, ніж для звичайного тесту «Розчинення», отже, забезпечити відповідність отриманих даних, розрахованим критеріям складніше. Іноді

необхідно вводити додатковий стандартний розчин для кількісних розрахунків у випробовуваних зразках з низьким відсотком вивільнення діючої речовини. В такому випадку валідація методики складається з двох субчастин, для кожної з яких обирається власний діапазон застосування та окремо розраховуються критерії.

Специфічність аналітичної методики доведено шляхом порівняння хроматограм розчину плацебо, виготовленого за технологією приготування таблеток, хроматограм розчину порівняння і хроматограм рухомої фази. Показана відсутність інтерференції піку валацикловіру, який визначається за методикою, з піками будь-якого з компонентів плацебо препарату та рухомої фази.

Діапазон застосування методики було визначено з урахуванням ступеня вивільнення діючої речовини у кожній точці відбору проб при дослідженні кінетики розчинення препарату. Оскільки препарат має різну розчинність у кислих (рН 1,2) і слабо кислих (рН 4,5) середовищах, то для зазначених середовищ були обрані наступні інтервали охоплення методики:

- 15 – 120 % відносно концентрації валацикловіру гідрохлориду в розчині порівняння для середовища з рН 4,5;
- 50 – 130 % відносно концентрації валацикловіру гідрохлориду в розчині порівняння для середовища з рН 1,2.

Лінійність, точність, правильність методики досліджувались з використанням об'єднаної схеми експерименту. У зазначених вище діапазонах концентрацій діючої речовини були виготовлені модельні розчини з використанням як розчинника середовищ рН = 1,2 та рН = 4,5 та побудовані графіки залежності площі піку валацикловіру від концентрації. Отримані після статистичної обробки дані щодо лінійності, точності та правильності наведені у таблицях 1, 2.

Таблиця 1. Результати дослідження лінійності кількісного визначення валацикловіру гідрохлориду за методикою «Кінетика розчинення»

Найменування параметра	Значення		Критерії параметрів лінійної залежності	
	pH 1,2	pH 4,5	pH 1,2	pH 4,5
b	1,01576	0,98731	-	-
s_b	0,00975	0,00575	-	-
$ a $	0,50195	0,20739	$\leq 1,92$	$\leq 1,20$
s_a	0,93188	0,42293	-	-
s_0	0,99968	0,67160	-	-
s_0/b	0,75897	0,68023	$\leq 1,58$	-
r	0,99968	0,99983	$\geq 0,99839$	$\geq 0,99779$

Таблиця 2. Валідаційні характеристики кількісного визначення валацикловіру гідрохлориду за методикою «Кінетика розчинення»

Валідаційна характеристика	pH 1,2	pH 4,5	Критерій, %
Правильність Δ , %	0,95	0,85	$\leq 0,96$
Точність* Δ_z , %	1,29	2,56	$\leq 3,0$

Примітка. – *для розрахунку використовували односторонній критерій Стюдента для імовірності 95 % і числа ступенів свободи $n-1$, де n – обсяг вибірки (число точок прямої).

Таким чином, отримані дані свідчать, що для запропонованої методики виконуються критерії щодо лінійності, точності та правильності.

Внутрішньолaboratorну точність досліджено не було, адже методика контролю вивільнення діючої речовини у часі з готової лікарської форми не потребує відтворення її в інших лабораторіях різними аналітиками. Вивчення кінетики розчинення препарату проводиться одним аналітиком на одному й тому ж обладнанні в дослідній лабораторії. Тому вплив внутрішньолaboratorних варіацій нівелюється.

Окремо досліджено поведінку діючої речовини у середовищі з pH 6,8.

Як було зазначено вище, валацикловіру гідрохлорид у такому середовищі є нестійким: деструкція молекули відбувається достатньо швидко. Для вивчення цього явища були проведені додаткові дослідження щодо поведінки валацикловіру гідрохлорид в середовищі розчинення з pH 6,8.

Отримане співвідношення «знайдено до введеного, %» свідчило про зменшення частки ва-

лацикловіру гідрохлориду в аналізованих зразках від першого до дев'ятого модельного розчину (від 93,25 % у першому до 85,90 % – у дев'ятому модельних розчинах). Таким чином, з врахуванням часу, необхідного для аналізу одного заколу (близько 5 хв), ступінь розкладу валацикловіру гідрохлориду складає близько 1 % за 15 хв. Втрата 7 % діючої речовини у першому модельному розчині є наслідком розкладу діючої речовини за час, витрачений на всю пробопідготовку при проведенні експерименту, та час, необхідний для кондиціювання хроматографічної колонки.

Результати вивчення валідаційних характеристик методики визначення валацикловіру гідрохлориду у середовищі з pH = 6,8 наведені у таблицях 3, 4.

Таким чином:

- вимоги щодо вільного члена лінійної залежності для методики не виконуються ($a > 1,92$);
- довірчий інтервал збіжності результатів (Δ_z , %) перевищує максимально припустиму невизначеність аналізу;

Таблиця 3. Результати дослідження лінійності кількісного визначення валацикловіру гідрохлориду за методикою «Кінетика розчинення» у середовищі з pH = 6,8

Найменування параметра	Значення	Критерії параметрів лінійної залежності
b	0,81334	-
s_b	0,00414	-
$ a $	5,94011	$\leq 1,92$
s_a	0,38935	-
s_0	0,32211	$\leq 1,58$
r	0,99991	$\geq 0,99865$

Таблиця 4. Валідаційні характеристики кількісного визначення валацикловіру гідрохлориду за методикою «Кінетика розчинення» у середовищі з рН = 6,8

Валідаційна характеристика	рН 6,8	Критерій, %
Правильність δ , %	11,46	$\leq 0,96$
Точність* Δ_z , %	5,10	$\leq 3,0$

Примітка – * для розрахунку використовували однобічний критерій Стюдента для імовірності 95 % і числа ступенів свободи $n-1$, де n – обсяг вибірки (число точок прямої).

– систематична похибка (δ , %) перевищує прийнятний критерій.

Отже, отримані результати свідчать про неприпустимість використання в якості середовища для «Кінетики розчинення» середовища з рН = 6,8 через хімічну нестійкість валацикловіру гідрохлориду в даному середовищі. В середовищах розчинення з водневим показником, близьким до нейтрального та вище, діюча речовина гідролізується до вихідних продуктів синтезу – ацикловір та валін. Валін, що з'являється в результаті розкладу, не детектується.

Висновки. В результаті проведених досліджень розроблено та провалідовано ВЕРХ-ме-

тодику кількісного визначення валацикловіру гідрохлориду для вивчення кінетики розчинення його таблеток, вкритих оболонкою у двох рекомендованих ДФУ* середовищах з водневим показником рН = 1,2 та рН = 4,5.

Результати проведених валідаційних досліджень доводять можливість застосування даної методики та дозволяють стверджувати, що отримані за методикою результати є достовірними.

Встановлено, що через хімічну нестійкість валацикловіру гідрохлориду, неможливе проведення «Кінетики розчинення» у нейтральному та лужному середовищах.

Література

1. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-ше вид. – Доповнення 2. – Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – 620 с.
2. Ершов Ф. И. Антивирусные препараты / Ф. Ершов. – М.: Медицина, 1998. – 192с.
3. Носач Л. М. Антивирусні хіміопрепарати / Л. Носач //

- Журнал практичного лікаря. – 2004. – № 5. – С. 35–39.
4. Носач Л. М., Повниця О. Ю. Доклінічні дослідження специфічної антивірусної дії лікарських засобів у культурі клітин на моделі аденовірусу. Методичні рекомендації / Л. Носач, О. Повниця // Вісник фармакології та фармації. – 2007. – №9. – С. 52–56.
5. Who Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. WHO Technical Report 937.

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОФИЛЕЙ РАСТВОРЕНИЯ ТАБЛЕТОК ВАЦИКЛОВИРА ГИДРОХЛОРИДА

С. Н. Гуреева, Ю. А. Кондратова, А. В. Заидзе, А. Н. Яковенко, А. Н. Стельмах

Открытое акционерное общество «Фармак»

Резюме: разработано ВЭЖХ-методику количественного определения валацикловира гидрохлорида для исследования профилей высвобождения действующего вещества из таблеток валацикловира гидрохлорида по 500 мг, покрытых оболочкой, полученных методом влажного гранулирования. Исследованы валидационные характеристики разработанной методики, установлено, что она приемлема для определения валацикловира гидрохлорида согласно методики «Кинетика растворения».

Ключевые слова: профили растворения, валидация, высокоэффективная жидкостная хроматография, количественное определение, валацикловира гидрохлорид.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE DISSOLUTION OF THE PREPARATION VALACYCLOVIR HYDROCHLORIDE IN THE FORM OF THE TABLETS

S. M. Hureyeva, Yu. A. Kondratova, A. V. Zaidze, O. M. Yakovenko, A. M. Stelmah

Public Joint Stock Company «Farmak»

Summary: there was developed HPLC-method quantification of valacyclovir hydrochloride for the study of the active substance release profile of valacyclovir hydrochloride tablets in 500 mg film-coated, obtained by wet granulation. There was investigated characteristics of validation of the developed technique, found out that it is acceptable for determining of valacyclovir hydrochloride according to the methodology "Kinetics of dissolution"

Key words: dissolution profiles, validation, high-performance liquid chromatography, quantification, valacyclovir hydrochloride.