

Рекомендована д. фармац. наук, доц. Л. В. Сидоренко
УДК 547.789:542.91:615.015.4
DOI 10.11603/2312-0967.2018.2.9085

ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ВЕРАПАМІЛУ ГІДРОХЛОРИДУ У СКЛАДІ ЛІКАРСЬКИХ ФОРМ

© М. І. Сулима¹, В. В. Огурцов¹, Ю. М. Жук², С. О. Васюк²

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького¹

Запорізький державний медичний університет²

Sumarta145@gmail.com

Мета роботи. Валідація методики кількісного спектрофотометричного визначення верапамілу гідрохлориду у складі лікарських форм згідно з ДФУ за такими валідаційними характеристиками, як лінійність, діапазон застосування, специфічність, прецизійність, правильність та робасність.

Матеріали і методи. У дослідженні використано робочий стандартний зразок верапамілу гідрохлориду, бромкрезоловий зелений (БКЗ), зразки готових лікарських форм вітчизняного та закордонного виробництва.

Реагенти і розчинники: стандартний зразок дилтіазему, бромкрезоловий зелений, ацетон.

Аналітичне обладнання: спектрофотометр Specord 200, ваги електронні АВТ-120-5DM, ультразвукова баня ELMASONICE60 Н.

Результати й обговорення. Експериментально встановлено, що верапамілу гідрохлорид взаємодіє з бромкрезоловим зеленим у середовищі ацетону з утворенням забарвленої сполуки з максимумом абсорбції при 409 нм. Проведено валідацію розробленої методики. Визначено основні валідаційні характеристики, а саме лінійність, прецизійність, правильність, робасність та діапазон застосування. Лінійність методики підтверджується у всьому діапазоні концентрацій 60–135 % (1,9648–4,4208 мг/100 мл). Запропонована методика відповідає вимогам ДФУ, які висувають до методик кількісного аналізу лікарських речовин.

Висновки. Проведено валідацію спектрофотометричної методики кількісного визначення верапамілу гідрохлориду у складі лікарських форм згідно зі стандартизованою процедурою валідації методом стандарту. Доведено, що за такими валідаційними характеристиками, як лінійність, специфічність, прецизійність, правильність та робасність методика є валідною.

Ключові слова: верапамілу гідрохлорид; бромкрезоловий зелений; спектрофотометрія; кількісне визначення; валідація.

Вступ. Аналітичний контроль лікарських препаратів відіграє важливу роль у системі забезпечення якості фармацевтичної продукції. Аналітичні методи використовують на всіх етапах життєвого циклу лікарського препарату: зі стадії розробки та випробувань, технологій виробництва та продовжують використовуватися при серійному випуску.

Досліджуючи стабільність АФІ на етапі встановлення термінів придатності лікарської форми, при дослідженні процесів очистки обладнання після виготовлення лікарської форми, а також з метою контролю якості лікарських засобів протягом терміну придатності необхідні різноманітні методики виявлення і кількісного визначення діючих речовин. Для цього необхідні високочутливі, специфічні та селективні аналітичні методики. Усім цим вимогам відповідає спектрофотометрія у видимій області спектра з використанням різноманітних кольорореагентів.

Для визначення верапамілу гідрохлориду у складі лікарських форм, а саме таблеток, ДФУ рекомендує

абсорбційну спектрофотометрію в ультрафіолетовій області (метод стандарту). Оптичну густину випробуваного розчину та розчину порівняння вимірюють при довжині хвилі 278 нм відносно компенсаційного розчину [1].

Разом з тим спектрофотометрія в ультрафіолетовій області спектра є менш специфічною та селективною, але в той же час більш експресною, тому використовується для систематичного контролю якості лікарських засобів.

На попередньому етапі роботи було розроблено високочутливу, селективну та просту у виконанні методику кількісного визначення верапамілу гідрохлориду у складі лікарських форм [2].

Згідно з ДФУ будь-яка аналітична методика, в тому числі й методика контролю якості конкретного лікарського засобу, яка буде вирішувати офіційні задачі, повинна бути валідована [3–5]. Валідацію не можна проводити для якоїсь загальної методики. Валідуватися може лише конкретна методика (конкретна лікарська форма конкретного виробника) [6].

Тому метою роботи стала валідація методик кількісного спектрофотометричного визначення верапамілу гідрохлориду у складі трьох лікарських форм промислового виробництва згідно з ДФУ за такими валідаційними характеристиками, як лінійність, діапазон застосування, специфічність, прецизійність, правильність та робастність.

Матеріали і методи. Об'єкти дослідження – таблетки «Верапамілу гідрохлорид» 40 мг («ТОВ «Дослідний завод «ГНЦЛС», Україна, серія 0040517), капсули «Вератард 180» 180 мг («ПАТ НВЦ «Борщівський ХФЗ», Україна, серія 010217) та таблетки «Лекоптин» 40 мг (Sandoz, Novartis company, Словенія, серія 602060).

У роботі використовували наступні реагенти і розчинники: РСЗ верапамілу гідрохлориду (Recordati Industria Chiniare Farmaceutica, Sp.A, Італія, серія 16100797), бромкрезоловий зелений (ТОВ НПФ «Синбіас», партія 47), ацетон (Lab Scan, Poch Ірландія, партія 4164/11). Аналітичне обладнання: спектрофотометр Specord 200, ваги електронні АВТ-120-5DM, ультразвукова баня ELMASONICE60 Н.

Загальна методика визначення верапамілу гідрохлориду

Аліквотну частину верапамілу гідрохлориду (0,1965-0,4421 мг) вміщують у мірну колбу на 10,00 мл, додають 1,00 мл 1,5 % розчину БКЗ в ацетоні та доводять ацетоном до позначки, перемішують. Через 5 хв вимірюють абсорбцію отриманого розчину на фоні компенсаційного розчину, який не містить досліджуваної речовини, при аналітичній довжині хвилі 409 нм.

Визначення верапамілу гідрохлориду в таблетках

Точну наважку ретельно розтертої таблеткової маси (близько 0,1 г) «Верапамілу гідрохлорид» 40 мг; (близько 0,05 г) «Вератард 180» 180 мг та (близько 0,1 г) «Лекоптин» 40 мг переносять у мірну колбу на 100,00 мл, доводять ацетоном до позначки, озвучують в ультразвуковій бані впродовж 1 хв. Після цього розчин фільтрують через паперовий беззольний фільтр («Синя стрічка»), відкидаючи перші порції фільтрату. З наступних порцій фільтрату беруть 1,00 мл розчину, переносять у мірну колбу на 10,00 мл, додають 1,00 мл розчину БКЗ, доводять ацетоном до позначки та через 5 хв вимірюють абсорбцію забарвлених розчинів на фоні компенсаційного розчину при аналітичній довжині хвилі 409 нм. Паралельно проводять дослід із 1,00 мл розчину порівняння верапамілу гідрохлориду. Розрахунок вмісту діючої речовини проводять за загальноприйнятною формулою.

Таблиця 1. Повна невизначеність результатів аналізу

Лікарський препарат	Δ_{SP}	Δ_{AS}	$max\Delta_{AS}$
«Верапамілу гідрохлорид» 40 мг	1,32	1,49	2,4
«Вератард 180» 180 мг	1,36	1,53	2,4
«Лекоптин» 40 мг	1,32	1,49	2,4

Результати й обговорення. *Прогноз повної невизначеності методики*

Для підтвердження того, що методика буде відтворюватися в іншій лабораторії, недостатньо результатів валідації в одній лабораторії, рівень обладнання якої може бути значно вищим припустимого ДФУ. Необхідно проводити прогноз повної невизначеності методики відповідно до вимог ДФУ.

При валідації необхідно враховувати не лише реальну повну невизначеність пробопідготовки, але і максимальну невизначеність для даного типу обладнання. Таку невизначеність називають повною невизначеністю методики аналізу.

Прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не повинна перевищувати максимально припустиму невизначеність результатів аналізу $max\Delta_{AS}$.

У випадку спектрофотометрії невизначеність кінцевої аналітичної операції складає 0,70 %, що є характерним на сьогодні для вітчизняної системи державних лабораторій контролю якості лікарських засобів [7].

Розрахунки невизначеності пробопідготовки проводили, враховуючи вимоги ДФУ до гранично припустимих похибок для мірного посуду, ваг та приладів (табл. 1).

Таким чином, прогнозована повна невизначеність результатів аналізу (Δ_{AS}) у кожному випадку не перевищує критичного значення ($max\Delta_{AS}$), тобто методики будуть давати коректні результати й в інших лабораторіях.

Специфічність

Згідно з ДФУ, специфічність характеризує можливість однозначно оцінювати аналізовану речовину за присутності інших компонентів, які можуть бути наявними у зразку (домішки, продукти розкладу, допоміжні речовини тощо).

Так, у випадку кількісного аналізу специфічність є доказом того, що методика дозволяє точно та правильно встановити вміст або активність саме аналізованої речовини у зразку.

Визначаючи специфічність для досліджуваних лікарських засобів, було використано непрямий підхід. У цьому випадку висновок про специфічність розробленої методики робили після визначення правильності методики методом добавок.

Лінійність та діапазон застосування

Лінійність – це здатність методики (у межах діапазону застосування) отримувати результати випробувань, прямо пропорційні концентрації (кількості) аналізованої речовини у зразку (рис. 1).

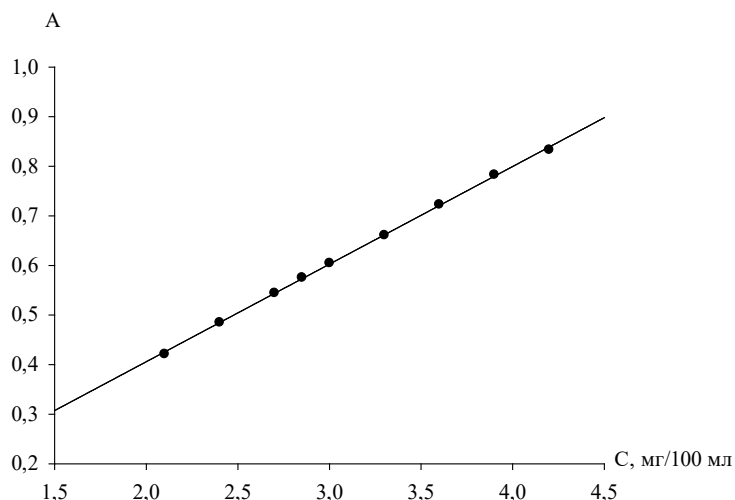


Рис. 1. Графік залежності оптичної густини від концентрації верапамілу гідрохлориду.

Як видно з даних таблиці 2, при визначенні верапамілу гідрохлориду за розробленої методикою виконуються вимоги до параметрів лінійної залежності, тобто лінійність методики підтверджується у всьому діапазоні концентрацій 60–135 % (1,9648–4,4208 мг/100 мл) [8, 9].

Прецизійність

Прецизійність аналітичної методики виражає ступінь близькості (ступінь розкиду) результатів визначень між серіями вимірювань, виконаних на різних пробах, які були взяті з однієї й тієї ж однорідної проби, в передбачених методикою умовах.

Прецизійність було визначено на рівні збіжності.

Для вивчення збіжності проводили дев'ять визначень у кожному випадку (три наважки (концентрації)/ три повтори). Одночасно вимірювали оптичну густину стандартного розчину. Вміст досліджуваної речовини у складі лікарських форм розраховували за загальноприйнятою формулою.

Згідно ДФУ було розраховано такі метрологічні характеристики збіжності, як середнє значення (\bar{O}), стандартне відхилення (S), відносне стандартне відхилення (RSD) та відносний довірчий інтервал одиничного значення (Δ_x) (табл. 3).

У всіх випадках однієї довірчий інтервал не перевищує максимально припустиму невизначеність аналізу, тому методики є прецизійними на рівні збіжності.

Правильність

Правильність характеризує ступінь відповідності між відомим значенням та значенням, отриманим за даною методикою. Правильність встановлювали методом добавок. Основною метою при визначенні правильності методом добавок є виявлення можливих систематичних похибок, які можуть виникати в результаті впливу допоміжних речовин, що входять до складу лікарської форми [6]. Отже, в ході роботи до трьох рівних проб лікарської форми додавали різні кількості розчину порівняння верапамілу гідрохлориду та аналізували тричі.

Таблиця 2. Метрологічні характеристики лінійної залежності $Y = bX + a$

Величина	Значення	Критерії	Висновок
$b \pm (s_b)$	$0,1969 \pm (0,0017)$	–	–
$a \pm (s_a)$	$0,0121 \pm (0,0055)$	$ a \leq \frac{0,32 \cdot \Delta A_s(\%)}{1 - (\chi_{\min}/100)} = 0,7834$	відповідає
$s_{x,0}(\%)$	0,0034	$\leq \Delta_{As}(\%)/t(95\%; 7) = 1,2667$	відповідає
r	0,9997	$\geq 0,9982$	відповідає

Таблиця 3. Визначення прецизійності результатів кількісного визначення верапамілу гідрохлориду у складі лікарських форм

Лікарська форма	\bar{O} (n=9)	S	RSD%	Δ_x
«Верапамілу гідрохлорид» 40 мг	$3,98 \times 10^{-2}$	$2,89 \times 10^{-5}$	$7,26 \times 10^{-2}$	$2,89 \times 10^{-5}$
«Вератард 180» 180 мг	$1,78 \times 10^{-1}$	$2,15 \times 10^{-4}$	$1,21 \times 10^{-1}$	$3,99 \times 10^{-4}$
«Лекоптин» 40 мг	$3,99 \times 10^{-2}$	$1,99 \times 10^{-5}$	$4,98 \times 10^{-2}$	$3,70 \times 10^{-5}$

Виходячи з того, що правильність є характеристикою близькості середнього результату величини, що вивчається до істинного значення, отримані в результаті аналізу дані щодо вмісту досліджуваної речовини виражали у відсотках від доданої кількості, розраховували середнє значення та проводили статистичну обробку результатів відносно теоретичного значення 100 %.

У кожному випадку практична незначущість систематичної похибки ($\bar{Z} - 100$) не перевищує максимально припустиму невизначеність аналізу ($0,32 \cdot \Delta_{As}$). Тому методики є правильними (табл. 4).

Робасність

Робасність – це здатність аналітичної методики не зазнавати впливу малих, контрольованих аналітиком змін в умовах виконання методики. Робасність є показником надійності методики при її використанні в зазначених умовах.

Оцінку робасності аналітичної методики було проведено на стадії розробки методики під час встанов-

лення оптимальних умов перебігу реакцій та визначення факторів, які можуть впливати на значення величини оптичної густини, а саме кількість доданих реагентів та стабільність аналізованих розчинів у часі.

Експериментальним шляхом було встановлено, що коливання кількості доданих реагентів у межах $\pm 10\%$ суттєво не впливає на значення оптичної густини досліджуваних розчинів.

При дослідженні стабільності у часі було встановлено, що значення оптичної густини аналізованих розчинів стабілізується через 5 хв (рис. 2) та залишається стабільним протягом щонайменше 45 хв.

Оскільки АНД не регламентує час, через який необхідно проводити вимірювання оптичної густини, перевіряли її стабільність протягом 45 хв. Для цього вимірювали оптичну густину досліджуваного розчину та розчину порівняння кожні 5 хв. Результати наведено у таблиці 5. Розраховували довірчий інтервал та порівнювали його з критичним значенням систематичної невизначеності методики аналізу ($\max\delta$).

Таблиця 4. Визначення правильності результатів кількісного визначення верапамілу гідрохлориду у складі лікарських форм

Лікарська форма	\bar{Z} (n=9)	S	Δ_z	$\bar{Z} - 100$	$0,32 \cdot \Delta_{As}$
«Верапамілу гідрохлорид» 40 мг	99,93	$1,12 \times 10^{-2}$	$2,08 \times 10^{-2}$	0,07	0,768
«Вератард 180» 180 мг	99,91	$5,70 \times 10^{-2}$	$1,06 \times 10^{-1}$	0,09	0,768
«Лекоптин» 40 мг	99,92	$3,67 \times 10^{-2}$	$6,82 \times 10^{-2}$	0,08	0,768

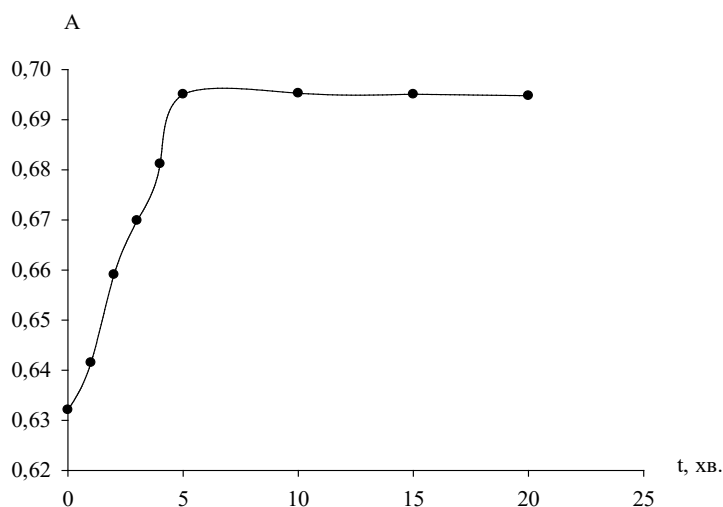


Рис. 2. Графік залежності оптичної густини досліджуваного розчину від часу

Таблиця 5. Стабільність розчинів у часі

t, хв	5	10	20	30	40	50	Середнє	RSD, %	$\Delta, \%$	$\max\delta\%$
A_0	0,6951	0,6953	0,6948	0,6950	0,6953	0,6952	0,6951	0,0279	0,0564	0,77
A	0,7024	0,7021	0,7023	0,7020	0,7024	0,7022	0,7022	0,0232	0,0468	

Висновок. Проведено валідацію спектрофотометричної методики кількісного визначення верапамілу гідрохлориду у складі 3 лікарських форм промислового виробництва згідно зі стандартизованою проце-

дурою валідації методом стандарту. Доведено, що за такими валідаційними характеристиками, як лінійність, специфічність, прецизійність, правильність та робасність методика є валідною.

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕРАПАМИЛА ГИДРОХЛОРИДА В СОСТАВЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ**М. И. Сулыма¹, В. В. Огурцов¹, Ю. М. Жук², С. А. Васюк²***Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого¹**Запорожский государственный медицинский университет²**Sumarta145@gmail.com*

Цель работы. Валидация методики количественного спектрофотометрического определения верапамила гидрохлорида в составе лекарственных форм согласно ГФУ по таким валидационным характеристикам, как линейность, диапазон применения, специфичность, прецизионность, правильность и робастность.

Материалы и методы. В исследовании использовано рабочий стандартный образец верапамила гидрохлорида, бромкрезоловый зеленый, образцы готовых лекарственных форм отечественного и иностранного производств.

Реагенты и растворители: стандартный образец верапамила гидрохлорида, бромкрезоловый зеленый, ацетон.

Аналитическое оборудование: спектрофотометр Specord 200, весы электронные АВТ-120-5DM, ультразвуковая баня ELMASONICE60 Н.

Результаты и обсуждение. Экспериментально установлено, что верапамил гидрохлорид взаимодействует с бромкрезоловым зеленым в среде ацетона с образованием окрашенного соединения с максимумом абсорбции при 409 нм. Проведена валидация разработанной методики. Определены основные валидационные характеристики, а именно линейность, прецизионность, правильность, робастность и диапазон применения. Линейность методики подтверждается во всем диапазоне концентраций 60–135 % (1,9648–4,4208 мг/100 мл). Предложенная методика соответствует требованиям ГФУ для методик количественного определения лекарственных веществ.

Выводы. Проведено валидацию спектрофотометрической методики количественного определения верапамил гидрохлорида в составе лекарственных форм по стандартизованной процедуре валидации методом стандарта. Доказано, что по таким валидационным характеристикам, как линейность, специфичность, прецизионность, правильность и робастность методика является валидной.

Ключевые слова: верапамил гидрохлорид; бромкрезоловый зеленый; спектрофотометрия; количественное определение; валидация.

METHOD VALIDATION OF VERAPAMIL HYDROCHLORIDE IN PHARMACEUTICAL FORMS BY SPECTROPHOTOMETRIC QUANTITATIVE DETERMINATION**M. I. Sulyma¹, V. V. Ogurtsov¹, Yu. M. Zhuk², S. O. Vasyuk²***Danylo Halytsky Lviv National Medical University¹**Zaporizhzhia State Medical University²**Sumarta145@gmail.com*

The aim of the work. Method validation of verapamil hydrochloride in pharmaceutical forms by spectrophotometric quantitative determination according to the State Pharmacopoeia of Ukraine.

Materials and Methods. Verapamil hydrochloride working standard, bromocresol green and the sample of finished dosage forms were used.

Reagents and solvents: A standard sample of verapamil hydrochloride, bromocresol green, acetone.

Analytical equipments: Spectrophotometer Specord 200, electronic scales AVT-120-5DM, ultrasonic bath ELMASONICE60 Н.

Results and Discussion. It was experimentally established that verapamil hydrochloride reacts with bromocresol green in acetone medium to form the colored reaction product with absorption maximum at 409 nm. The proposed method was subject to validation tests. The linearity, precision, accuracy, robustness and scope of application were tested to validate the method. Particularly, linearity of the method is confirmed throughout the range of concentrations 60–135 % (1.9648–4.4208 mg/100 ml). The proposed method meets the requirements to the State Pharmacopoeia of Ukraine for methods of quantitative determination of medicinal substances. Thus, this method could be widely applicable for the quality control and routine analysis.

Conclusions. The validation of the spectrophotometric method of quantitative determination of verapamil hydrochloride in pharmaceutical formulation according to the standardization validation procedure is carried out. It is proved that the method developed by such validation characteristics as linearity, precision, correctness and robustness is correct.

Key words: verapamil hydrochloride; bromocresol green; spectrophotometry; quantitative determination; validation.

Список літератури

1. Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Харків : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2014. – Т. 3. – 732 с.

2. M. Sulyma. Spectrophotometric determination of verapamil hydrochloride using bromokresol green / M. Sulyma // Der Pharma Chemica. – 2018. – No. 10 (5). – P. 143–147.

3. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків : РІРЕГ, 2001. – 556 с. – Доповнення 1. – 2004. – 520 с. – Доповнення 2. – Харків : Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 2008. – 620 с. – Доповнення 3. – 2009. – 280 с. – Доповнення 4. – 2011. – 540 с.

4. European Pharmacopoeia. 8th edition. European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). – Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France. – on line.

5. Technical Guide for the Elaboration of Monographs. European Pharmacopoeia. European Directorate for the Qual-

ity of Medicines. – 4th edition. – 2005. – Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France 2005. – 67 p.

6. Гризодуб А. И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств / А. И. Гризодуб. – Харьков : Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств». – 2016. – 396 с.

7. Воспроизводимость фармакопейных спектрофотометрических методик количественного определения лекарственных средств в разных лабораториях / А. И. Гризодуб, Н. Н. Зволинская, Н. Н. Архипова [и др.] // Фармаком. – 2004. – № 2. – С. 20–34.

8. Гризодуб А. И. Валидация спектрофотометрических методик количественного анализа лекарственных средств в соответствии с требованиями ГФУ / А. И. Гризодуб // Фармаком. – 2002. – № 3. – С. 42–50.

9. Стандартизованная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта / А. И. Гризодуб, Д. А. Леонтьев, Н. Н. Денисенко, Ю. В. Подпружинников // Фармаком. – 2004. – № 3. – С. 3–17.

References

1. The State Pharmacopoeia of Ukraine: in 3 vol. Kharkiv: Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center of Quality of Medicinal Products. Ed.2. Kharkiv: Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center of Quality of Medicinal Products.2014; V. 3:732 p.Ukrainian.

2. Sulyma M. [Spectrophotometric determination of verapamil hydrochloride using bromokresol green]. J Der Pharma Chemica. 2018;10(5):143-4.

3. The State Pharmacopoeia of Ukraine. [Державна фармакопея України] Kharkiv:Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center of Quality of Medicinal Products. 1 ed. X; 2001; 556 p. Ed. 1. 2004; 520 p. Ed. 2. Kharkiv: Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center of Quality of Medicinal Products.2008;620 p. Ed 3. 2009;280 p. Ed. 4.2011; 540 p. Ukrainian.

4. The European Pharmacopoeia. 8th edition. European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). – Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France. – on line.

5. Technical Guide for the Elaboration of Monographs. European Pharmacopoeia. European Directorate for the Quality of Medicines. – 4th edition. 2005. Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France 2005; 67 p.

6. Grisodub AI. [Standardized procedures for the validation of drug quality control methods. Kharkiv: Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center of Quality of Medicinal Products]. 2016;396 p. Ukrainian.

7. Grisodub AI, Evolinskaya NN, Arhipova NN. [Reproducibility of pharmacopoeia spectrophotometric methods of quantitative determination of drugs in different laboratories]. Farmakom. 2004;2:20-4. Ukrainian.

8. Grisodub AI. [Validation of drug quality control methods according to SPU]. Farmakom. 2002;3:42-8. Ukrainian.

9. Grisodub AI, Leontiev DA, Podpruzhnynikov YuV. [Standardized procedures for the validation of drug quality control methods using standard method]. Farmakom. 2004;3:3-14. Ukrainian.

Отримано 15.03.2018