

**ВАЛІДАЦІЯ ФОТОКОЛОРИМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ  
КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ РИБОФЛАВІНУ В РОЗЧИНАХ  
АПТЕЧНОГО ВИГОТОВЛЕННЯ**

**Ключові слова:** валідація аналітичної методики, розчин рибофлавіну, фотоколориметрична методика кількісного визначення

Важливим кроком у розвитку фармацевтичної галузі нашої країни було видання Державної фармакопеї України і нині поступово створюється нормативно-правова база діяльності аптечної мережі [9]. Особливу увагу слід приділяти змісту наказу МОЗ України № 626 від 15.12.2004 «Про затвердження правил виробництва (виготовлення) лікарських засобів в умовах аптеки» (із змінами, внесеними згідно з наказом Міністерства охорони здоров'я № 361 від 19.07.2005 р., а саме пункту 4.4., за яким «Суб'єкт господарювання повинен уживати заходів щодо валідації технологічних процесів, які здійснюються у виробничих приміщеннях, і методик контролю якості сировини та виготовлених лікарських засобів», що застосовується з 01.01.2009 р. Отже, всі аналітичні методики і випробування, що входять до монографій або АНД, мають бути валідовані [8].

Валідація аналітичної методики — це експериментальний доказ того, що методика придатна для розв'язання поставлених завдань. У статті ДФУ описуються процедури, які застосовуються для валідації методик і випробувань. Валідацію проводять на атестованому і перевіреному обладнанні.

Оскільки до окремих статей включають різні інструментальні та неінструментальні випробування (ідентифікація, контроль домішок, кількісне визначення і т.п.), вимоги до валідації залежать від типу випробування і застосованого аналітичного методу [4].

Сьогодні стандартний алгоритм проведення валідації для різноманітних аналітичних методик, які можна відтворювати в аптеках та контрольно-аналітичних лабораторіях, в українській науковій літературі майже невисвітлений. Тому метою нашої роботи була валідація аналітичної методики кількісного визначення для лікарського засобу або внутрішньоаптечної заготовки, які користуються попитом. Критерієм обрання методики була також можливість проведення аналізу в аптечних умовах.

Для досліджень було обрано внутрішньоаптечну заготовку — 0,02 % водний розчин рибофлавіну, яку, за статистикою рецептури аптек Харківської області, що мають ліцензію на приготування лікарських засобів, готують та використовують для приготування очних крапель.

Виходячи з фізико-хімічних властивостей рибофлавіну та згідно з розглянутою літературою [1, 7, 10, 12], лікарські форми, які містять рибофлавін, можна аналізувати, використовуючи інструментальні методи кількісного визначення: спектрофотометричний, флуориметричний та фотоколориметричний. При кількісному визначенні рибофлавіну також можна користуватися титриметричними методами: визначенням за азотом, алкаліметричним визначенням рибофлавіну в розчині після окиснення його перйодатом калію, алкаліметричним визначенням рибофлавіну в розчині після окиснення його нітратом срібла,

цериметричним аналізом.

Як об'єкт валідації було обрано фотоколориметричну методику кількісного визначення рибофлавіну у водних розчинах, оскільки цей метод достатньо експресний та доступний.

### Експериментальна частина

Дослідження проводилися з використанням таких приладів: фотоколориметра КФК-3; вагів АВ 204 S/A METTLER TOLEDO, рН-метра РВ-11 фірми «Sartorius AG» (Німеччина). Для роботи використовували мірний посуд класу А (першого класу) та реактиви, що відповідають вимогам ДФУ, а також субстанцію рибофлавіну (Roche Vitamine GmbH, Німеччина; серія UQ 20720156 від 12.01.2004 р., сертифікат аналізу № 290 від 29.01.2004 р.), що відповідає вимогам ВР 98, Eur. Ph. 2000.

*Фотометрична методика кількісного визначення рибофлавіну.* 5 мл досліджуваного розчину переносять у мірну колбу місткістю 50 мл, доводять водою Р до мітки. Потім при довжині хвилі 440 нм вимірюють величину оптичної густини, розчин порівняння — вода Р [7]. Результат порівнюють з оптичною густиною стандартного зразка й обчислюють концентрацію за розрахунковою формулою [4]:  $X = C_i / C_{st} = A_i / A_{st}$ .

*Приготування модельних — робочих розчинів та розчину порівняння.* Готували п'ять розчинів з точними наважками таких концентрацій: 70; 85; 100; 115 і 130 %. Точну наважку (m, г) поміщали в мірну колбу місткістю 250 мл і суспендували у 15 мл води Р. Після того як субстанція цілком була змочена, додавали 170 мл води Р та перемішували до повного розчинення при нагріванні, доводячи розчин до кипіння. Потім, після повного охолодження до  $20\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ , об'єм розчину доводили водою Р до 250,0 мл. Далі за методикою готували розведення: 5,0 мл одержаного розчину поміщали в мірну колбу місткістю 50 мл і доводили об'єм розчину водою Р до 50,0 мл (готували три паралельні розведення для кожного досліджуваного розчину з п'яти концентрацій).

Розчин порівняння готували за таких саме умов, використовуючи точну наважку 0,0200 г та мірну колбу місткістю 100 мл, далі готували розчин порівняння за вищенаведеною методикою.

Валідацію методики проводили відповідно до вимог ДФУ [4–6]. Під час валідації були розглянуті такі параметри: діапазон застосування, специфічність, відтворюваність, лінійність, робасність, збіжність, правильність, внутрішньо-лабораторна точність.

### Результати дослідження та їх обговорення

*Діапазон застосування (range) аналітичної методики.* За ДФУ мінімальний діапазон застосування для методик кількісного визначення становить 80–120 %. Але беручи до уваги вимоги АНД [8], ми обрали діапазон застосування від 70 до 130 % відносно вмісту рибофлавіну в 0,02 % водному розчині.

*Невизначеність аналітичної методики.* Спочатку теоретично вели розрахунок критеріїв прийнятності методики аналізу [6]: максимально допустимої повної невизначеності —  $\max \Delta_{As} = 4,8\%$ , яка пов'язана з симетричними допусками вмісту  $\pm 15\%$  [8, додаток 5], максимальної систематичної похибки —  $\max \delta = 1,54$ , вклад плацебо в сумарну величину фонового поглинання є незначущим і ним можна знехтувати, якщо одержані результати ( $\delta_{exc} \leq 0,5\%$ ) не перевищують критичного значення, критичне значення для остаточного стандартного відхилення  $RSD_0\% = \max \Delta_{As} / t(95, n-2) = 2,71$ , індексу кореляції  $R_c = 0,9924$  і практичної невизначеності вільного члену лінійної залежності —  $a = 5,12$ .

*Специфічність.* Для визначення специфічності було досліджено залежність інтенсивності поглинання від довжини хвилі розчинів рибофлавіну з контро-

льованим значенням рН (розчин при-  
готовлений за ДФУ) та досліджувано-  
го розчину (рис. 1).

Встановлено, що відношення опти-  
чної густини в максимумі при дов-  
жині хвилі 373 нм до оптичної густини  
в максимумі 267 нм та відношення опти-  
чної густини в максимумі при дов-  
жині хвилі 444 нм до оптичної густини  
в максимумі 267 нм становлять 0,33 та  
0,389 відповідно, що відповідає нормам  
ДФУ [5].

Крім того, для підтвердження спе-  
цифічності методики розраховували  
відносну систематичну похибку, яку  
вносить розчинник, тобто вклад плацебо. Для цього тричі вимірювали оптич-  
ну густину ( $A_{blank}$ ) розчину плацебо з вийманням кювети та оптичну густину ( $A_{st}$ )  
розчину порівняння. Знайдені середні значення  $A_{blank} = 0,0003$  і  $A_{st} = 0,335$   
свідчать, що вклад плацебо в сумарне поглинання препарату становить  
 $\delta_{exc} = 100 \cdot 0,0003/0,335 = 0,09\%$ , що підтверджує відсутність вагомого впливу  
на результати вимірів.

Для визначення лінійності було одержано чотири значення оптичних гу-  
стин для розчину порівняння та 15 значень оптичних густин модельних роз-  
чинів. Розраховували відношення середніх значень оптичних густин для  
кожного з 15 розчинів до середнього значення оптичної густини розчину по-  
рівняння, одержуючи величини  $X_i = C_i/C_{st} \cdot 100\%$  і  $Y_i = (A_i/A_{st}) \cdot 100$ . Працю-  
вали в нормалізованих координатах, подаючи концентрації та аналітичний  
сигнал у відсотках до номінальних значень [2, 3]. Визначали також величи-  
ну  $Z = 100 \cdot (Y_i/X_i)$ , яка є знайденою концентрацією у відсотках до введеної  
(рис. 2). Результати статистичного розрахунку лінійності наведені нижче.

Кутовий коефіцієнт лінійної залежності  $b = 1,0056$ ,  $S_b = 0,0201$ ;  
вільний член лінійної залежності  $a = -0,2852$ ,  $S_a = 2,0538$ ;  
критичне значення для вільного члена лінійної залежності  $a = 5,1200$ ;  
остаточне стандартне відхилення  $S_{rest} = 0,9530$ ;  
критичне значення для остаточного стандартного відхилення  $RSD_0 = 2,7105$ ;  
коефіцієнт кореляції методики  $r = 0,9994$ ;  
критерій лінійного коефіцієнта кореляції  $R_c = 0,9924$ .

Висновок: відповідає.

При адаптації методики  
для її проведення в аптечних  
умовах рекомендується вивча-  
ти таку валідаційну характери-  
стику, як робасність. Оцінку  
робасності проводили з ураху-  
ванням типу методики, тобто  
для фотоколориметричного  
методу ми обрали для дослід-  
ження такі параметри:

— стійкість у часі аналі-  
тичних розчинів (приготов-  
лених за вищенаведеною  
методикою);

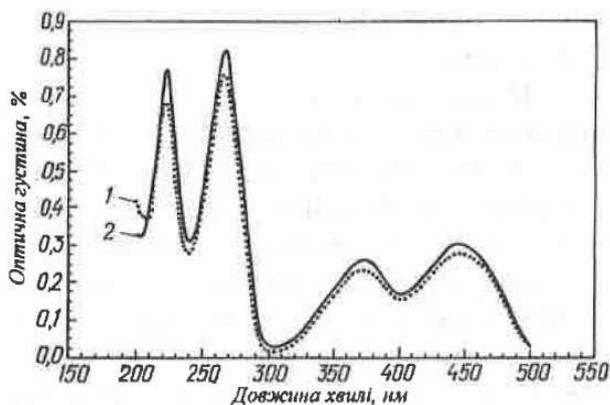


Рис. 1. Спектр поглинання розчинів рибофла-  
віну:

1 — розчину рибофлавіну, приготованого за ДФУ, 2 — випро-  
буваного розчину рибофлавіну

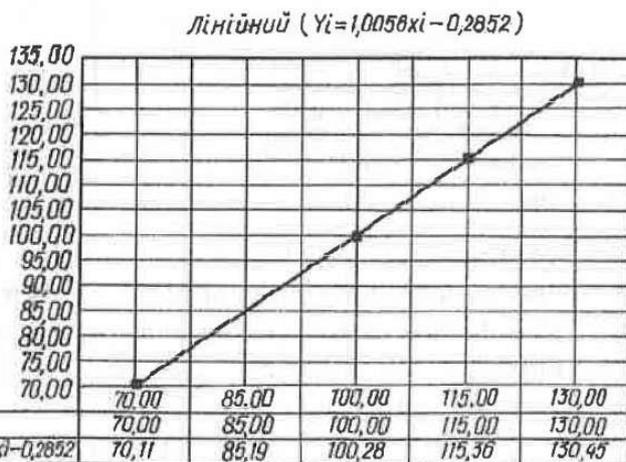


Рис. 2. Графік залежності оптичної густини від концентрації  
рибофлавіну

— вплив рН середовища на стабільність оптичного поглинання розчину рибофлавіну.

Перед проведенням основної експериментальної частини валідації необхідно визначити стійкість аналітичних розчинів у часі. При нестабільності досліджуваного розчину подальше проведення валідації не має сенсу через велику похибку вимірювання. У досліджуваній методиці не зазначено, через який проміжок часу необхідно проводити дослід після приготування аналітичного розчину, тому ми обрали діапазон часу — 1 годину. Отримані результати, наведені в табл. 1, свідчать, що стійкість аналітичних розчинів за результатами статистичної обробки не перевищує межі абсолютної допустимої похибки. Нерівність  $\Delta_i \% \leq 0,32 \cdot \max \Delta_{As} = \max \delta$  виконується, отже, розчини стабільні протягом години і цього часу достатньо для проведення аналізу.

Таблиця 1

Результати вивчення стабільності досліджуваного розчину та розчину порівняння

№ р-ну	Термін дослідження стабільності t, хв Аі*					Середнє	RSD, %	$\Delta t, \%$	$\max \delta, \%$
	0	15	30	45	60				
1	0,3350	0,3357	0,3360	0,3370	0,3353	0,3360	0,2379	0,5071	1,54
2	0,3333	0,3323	0,3317	0,3340	0,3323	0,3327	0,2780	0,5926	

\*Значення оптичної густини є середнім трьох вимірювань розчину.

Для вивчення впливу рН середовища до досліджуваних розчинів (85; 100 і 115 %) додавали по одній краплі 0,01 М розчину хлористоводневої кислоти або 0,01 М розчину гідроксиду натрію, щоб відтворити коливання рН  $\pm 10 \%$  (від 4,97 до 6,07). Для отриманих модельних розчинів оптичну густину вимірювали при обраній довжині хвилі. Статистична оцінка впливу рН на результат аналізу наведена в табл. 2.

Таблиця 2

Вплив рН на поглинання оптичної густини аналітичними розчинами

Наважки рибофлавіну, мг ( $m_n = 0,0200$ )	Оптичні густини Аі*			Середнє			Середнє	$S_{r, pH}$	RSD <sub>pH</sub> , %	$\Delta_{pH}, \%$	$\max \delta, \%$
	випробування			випробування							
	1 + 1 краплю 0,01 М розчину хлористоводневої кислоти	2 — без додавання	3 + 1 краплю 0,01 М розчину гідроксиду натрію	1	2	3					
0,0425	0,285	0,286	0,287	0,2853	0,2863	0,2873	0,2863	0,0010	0,1000	0,29	1,54
	0,285	0,287	0,289								
	0,286	0,286	0,286								
0,0500	0,332	0,332	0,332	0,3320	0,3327	0,3330	0,3326	0,0005	0,0509	0,15	1,54
	0,331	0,333	0,333								
	0,332	0,333	0,334								
0,0575	0,389	0,390	0,390	0,3893	0,3907	0,3897	0,3899	0,0007	0,0694	0,20	1,54
	0,389	0,391	0,389								
	0,390	0,391	0,390								

\* Значення оптичної густини є середнім трьох вимірювань розчину.

Користуючись принципом паралельного проведення валідації, збіжність та правильність досліджуваної методики визначали одночасно. Оптичну густину всіх 15 розчинів вимірювали при аналітичній довжині хвилі і встановлювали відношення знайденої концентрації до введеної у відсотках (табл. 3).

Досліджувана методика є коректною, оскільки для  $\Delta_z$  виконуються вимоги:  $\Delta_z \% \leq \max \Delta_{As} = 4,8 \%$ . Методика не має значущої систематичної похибки.

Внутрішньолабораторну точність оцінювали за результатами аналізу 15 модельних зразків різних серій. Їх дослідження проводились у два різні дні та

Таблиця 3

Результати перевірки внутрішньолабораторної точності, правильності та збіжності

Внутрішньолабораторна точність										
№ модельного розчину	наважки рибофлавіну, мг ( $m_{\text{ст}}=0,0200$ )		введено рибофлавіну у % до концентрації розчину порівняння ( $X_{\text{інфакт}}\%$ )		оптичні густини $A_i$		знайдено концентрацію рибофлавіну у % до концентрації розчину порівняння ( $Y_i\%$ )		знайдено концентрацію рибофлавіну у % до введеного $Z_i=100(Y_i/X_i)$	
	випробування		випробування		випробування		випробування		випробування	
	1	2	1	2	1 ( $A_{\text{ст}}=0,335$ )	2 ( $A_{\text{ст}}=0,3166$ )	1	2	1	2
1					0,235	0,236	70,15	74,54	100,21	99,39
2	0,0350	0,0375	70,00	75,00	0,235	0,236	70,15	74,54	100,21	99,39
3					0,235	0,235	70,15	74,23	100,21	98,97
4					0,286	0,281	85,37	88,76	100,44	98,62
5	0,0425	0,0450	85,00	90,00	0,286	0,282	85,37	89,07	100,44	98,97
6					0,288	0,280	85,97	88,44	101,14	98,27
7					0,332	0,317	99,10	100,13	99,10	100,13
8	0,0500	0,0500	100,00	100,00	0,332	0,316	99,10	99,81	99,10	99,81
9					0,332	0,317	99,10	100,13	99,10	100,13
10					0,390	0,350	116,42	110,55	101,23	100,50
11	0,0575	0,0550	115,00	110,00	0,390	0,350	116,42	110,55	101,23	100,50
12					0,390	0,350	116,42	110,55	101,23	100,50
13					0,436	0,400	130,15	126,34	100,11	101,07
14	0,0650	0,0625	130,00	125,00	0,436	0,399	130,15	126,03	100,11	100,82
15					0,436	0,399	130,15	126,03	100,11	100,82
Середнє Z%									100,27	99,86
Об'єднане середнє Z%									100,06	
Відносне стандартне відхилення, $S_{\text{ст}}\%$									0,7443	0,8788
Відносний довірчий інтервал $\Delta_{\text{ст}}\%$									0,0874	0,1032
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta_{\text{ст}}\%$									4,8	
Об'єднана середня систематична похибка $\delta$									-0,0631	
Критерій невизначеності систематичної похибки									1,54	

різними аналітиками в умовах однієї лабораторії. Для приготування двох різних серій було взято різні наважки в обраному концентраційному діапазоні. Для приготування розведень цих серій використовували різний лабораторний мірний посуд. Під час підготовки розчинів та виконання методики було можливе коливання температури, вологості повітря, атмосферного тиску та інших внутрішньолабораторних факторів впливу на проведення аналізу.

Статистично обчисливши [2, 3, 5, 6] знайдені значення  $Z_i\%$ , розраховували відносне стандартне відхилення ( $RSD_{\text{ст}}$ ), єдине середнє значення відносного стандартного відхилення ( $RSD_{\text{інтра}}$ ) та відносний довірчий інтервал ( $\Delta_{\text{інтра}}$ ). Результати дослідження наведені в табл. 3.

Щоб дослідити відтворюваність даної методики в умовах іншої лабораторії, було проведено вимірювання оптичної густини розчинів однієї серії на іншому обладнанні, в різні дні, у двох різних лабораторіях.

Отримані результати, наведені в табл. 4, являють собою результати порівняння статистичних відхилень двох різних експериментів об'єданого середнього значення та єдиного відносного стандартного відхилення. Отримані метрологічні дані свідчать, що зазначена методика може бути відтворена в іншій лабораторії з довірчою вірогідністю 95 % відхилення єдиного значення  $100 \pm 0,41\%$ .

Таблиця 4

## Результати дослідження міжлабораторної точності

Відтворюваність методики в різних лабораторіях та на приладах різної точності та чутливості			
№ розчину	величини $Z_i$		$\max\{X_k - X_j\}$
1	99,39	100,37	-0,98
2	99,39	99,88	-0,49
3	98,97	100,37	-1,40
4	98,62	100,04	-1,42
5	98,97	99,63	-0,66
6	98,27	99,63	-1,36
7	100,13	100,00	0,13
8	99,81	99,63	0,18
9	100,13	100,37	-0,24
10	100,50	100,30	0,20
11	100,50	100,30	0,20
12	100,50	99,97	0,53
13	101,07	100,37	0,70
14	100,82	100,07	0,75
15	100,82	100,37	0,45
Середнє	99,86	100,09	
Об'єднане середнє $Z_{Transfer} \%$	99,97		
$Sz_{Transfer} \%$	0,8864	0,3135	
$SDz_{Transfer} \%$	0,6648		
$\Delta_{Transfer} \%$	0,4130		
Максимальна різниця між отриманими значеннями $\max\{X_k - X_j\} \leq (2 \cdot t(95\%, (m \cdot (n - 1))) \cdot RSD_{Intra})$	1,5993		

## Висновки

1. Здійснено валідацію методики кількісного визначення рибофлавіну фотоколориметричним методом відповідно до вимог ДФУ.

2. Встановлено, що методика, валідована і придатна для кількісного визначення рибофлавіну (0,02 %) у водному розчині, відповідає вимогам Фармакопеї за специфічністю, лінійністю, точністю та робастністю.

3. Отримані результати свідчать, що методика може бути використана при аналізі 0,02 % водного розчину рибофлавіну в аптечних закладах.

1. Беликов В. Г., Степанюк С.Н. // Фармація. — 1988. — №2. — С. 39—41.
2. Гризодуб А.И. // Фармаком. — 2002. — № 3. — С. 42—50.
3. Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Денисенко Н.В. и др. // Там же. — 2004. — № 3. — С. 3—17.
4. Державна фармакопея України. — Х.: РІРЕГ, 2001. — 556 с.
5. Державна фармакопея України: Доп. 1.— Х.: РІРЕГ, 2004. — 494 с.
6. Евтифеева О.А., Георгиянц В.А. // Фармаком. — 2007. — № 1. — С. 69—81.
7. Кулешова М. И., Гусева Л. Н., Сивицкая О.К. Анализ лекарственных форм, изготовленных в аптеках. — М.: Медицина, 1989. — 288 с.
8. Наказ МОЗ України № 626 від 15.12.2004 р. (із змінами та доповненнями). «Про затвердження Правил виробництва (виготовлення) лікарських засобів в умовах аптеки» // Юридичні аспекти фармації. — Х., 2006. — Т. 3. — С. 49—59.
9. Терно И.С., Тихонов А.И., Гризодуб А.И. и др. // Фармаком. — 2005. — № 2/3. — С. 104—115.
10. Charles O. Wilson, Ole Gisvold, Robert F. Doerge. Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry. — London, 1977. — 425 p.
11. European Pharmacopoeia. 5<sup>th</sup> ed. — Electronic version. — 2779 p.
12. Richard S. Rivlin. Riboflavin. — New York and London: Plenum Press, 1996. — 211 p.

Надійшла до редакції 05.04.2007.

*В.А.Георгиянц, О.А.Евтеева, А.А.Здорик*

**ВАЛИДАЦИЯ ФОТОКОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РИБОФЛАВИНА В РАСТВОРАХ АПТЕЧНОГО ПРИГОТОВЛЕНИЯ**

**Ключевые слова:** валидация аналитической методики, раствор рибофлавина, фотоколориметрическая методика количественного определения

Приведена статистически обоснованная процедура валидации фотоколориметрической методики количественного определения рибофлавина во внутриаптечной заготовке (0,02 % водный раствор рибофлавина). Валидацию аналитической методики проводили по схеме, приведенной в ГФУ. Были рассмотрены следующие параметры: диапазон применения, специфичность, воспроизводимость, линейность, робастность, сходимость, правильность, внутрилабораторная точность, что позволило определить возможность применения методики, исследуемой для анализа 0,02 % водного раствора рибофлавина.

*V.A.Georgiyanc, O.A.Evtifeeva, O.A.Zdorik*

**THE VALIDATION OF THE PHOTOCOLORIMETRIC QUANTITATIVE DETERMINATION METHOD FOR THE RIBOFLAVIN SOLUTIONS OF THE DRUGSTORE PREPARATION**

**Key words:** validation of the analytical method, riboflavin solution, photocolo-rimetric quantitative determination method

**SUMMARY**

In the article is brought statistical motivated procedure of the validation of the photocolorimetric quantitative determination method of the riboflavin in the intra-drugstore storage (water solution of the riboflavin 0,02 %). The validation of the analytical methods held at scheme, which is specified in SPU; the following parameters were considered: range of application, specificity, linearity, exactness, accuracy, robustness, convergence of the results, intra-laboratory exactness, that has allowed to define the ability of the methods to solve the delivered problems.