

С.А.ШКЛЯЄВ, канд. фармац. наук, О.О.ЦУРКАН, д-р фармац. наук, проф., О.П.КОЛЯДИЧ, канд. фармац. наук, О.О.КУЛІКОВА, головний спеціаліст*

*Державна лабораторія з контролю якості лікарських засобів ДУ «ІФТ» АМН України, *Держлікинспекція МОЗ України*

ВАЛІДАЦІЯ ВЕРХ-МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ АЗИТРОМІЦИНУ В ЛІКАРСЬКИХ ФОРМАХ ТА ЇЇ ПОРІВНЯННЯ ІЗ СФ-МЕТОДИКОЮ ЗА РЕАКЦІЮ З 2-НІТРОБЕНЗАЛЬДЕГІДОМ

Ключові слова: вискоєфективна рідинна хроматографія, спектрофотометрія, азитроміцин, 2-нітробензальдегід, валідація

Аналіз антибіотиків, зокрема азитроміцину, є поширеним завданням в аналітичних лабораторіях. Спектр методик, що використовують, дуже широкий: від мікробіологічного визначення за допомогою мікроорганізмів, до сучасних хроматографічних технологій. Оснащення вітчизняних лабораторій часто не дозволяє використовувати всі можливі методи, тому, як правило, методики зазнають впровадження з подальшою валідацією для того, щоб бути впевненими в отриманих результатах. Однак використання альтернативних методик є можливим шляхом для здешевлення аналізу та іноді взагалі єдиним способом отримати результати аналізу. Наприклад, як альтернатива загальноприйнятій методиці, що використовується для визначення азитроміцину в лікарських формах – методу вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [1], нами було розроблено та валідовано СФ-методику на основі реакції з 2-нітробензальдегідом [2].

Таким чином, метою даного дослідження було впровадження та валідація ВЕРХ-методики кількісного визначення азитроміцину в лікарських формах та порівняння результатів аналізу серії лікарського засобу «АЗИТРОМІЦИН-АСТРАФАРМ», капсули по 250 мг, отримані за допомогою ВЕРХ-методики, та попередньо розроблені СФ-методики на основі реакції з 2-нітробензальдегідом.

Експериментальна частина

Об'єкти дослідження, застосовані реагенти та обладнання

Об'єктами дослідження були такі лікарські засоби: «АЗИТРОМІЦИН-АСТРАФАРМ», капсули по 250 мг серії 030908.

У роботі було використано реактиви і розчинники: РСЗ азитроміцину серії 60308062; амонію дигідрофосфат; аміаку розчин концентрований; метанол; ацетонітрил; вода очищена.

Аналітичне обладнання: рідинний хроматограф «Bischoff» у комплекті із СФ-детектором, автосамплером, термостатом колонок, системою встановлення градієнта, інтерфейсом для управління з ПК, ваги електронні «Precisa XT 220A», мірний посуд класу А.

Загальна методика кількісного визначення азитроміцину

Хроматографування проводили на рідинному хроматографі за таких умов:

- колонка «Extend-C18» розміром 250×4,6 мм, яка заповнена сорбентом з розміром часток 5 мкм;

- рухома фаза А: розчин 1,80 г/л динатрію гідрофосфату безводного, рН 8,9;
- рухома фаза В: ацетонітрил – метанол (75:25);
- елюент: суміш рухомих фаз А та В у співвідношенні 45:65;
- детектування за довжини хвилі – 210 нм;
- температура колонки – 50 °С;
- швидкість елюенту – 1,0 мл/хв;
- об'єм дозування – 20 мкл.

Валідація методики визначення азитроміцину

Валідаційні критерії [3]. Невизначеність пробопідготовки, специфічність, лінійність, збіжність, правильність, стабільність, внутрішньолaboratorна точність. Процедуру проведення валідації докладно викладено у [4, 5].

Запасний розчин азитроміцину в розчиннику (суміш розчину 1,73 г/л амонію дигідрофосфату рН 10, метанолу та ацетонітрилу у співвідношенні 35:35:30) концентрацією 10 мг/мл.

Моделльні розчини готують із запасного розведення розчинником до концентрацій 0,6 мг – 1,4 мг/мл.

Плацебо. Виходячи із складу препарату до плацебо входили магнію стеарат та целюлоза мікрокристалічна.

Результати дослідження та їх обговорення

Невизначеність пробопідготовки. Відповідно до методики приготування розчинів невизначеність пробопідготовки становить $0.57 < \delta_{\Delta_s} = 1.024$. Повна прогнозована невизначеність методики становить $1.33 < \Delta_{\Delta_s} = 3.2$. Отримані дані свідчать про відсутність впливу пробопідготовки на результати визначення азитроміцину.

Специфічність, правильність, збіжність. Хроматограми модельних розчинів та розчину плацебо наведені на рис. 1.

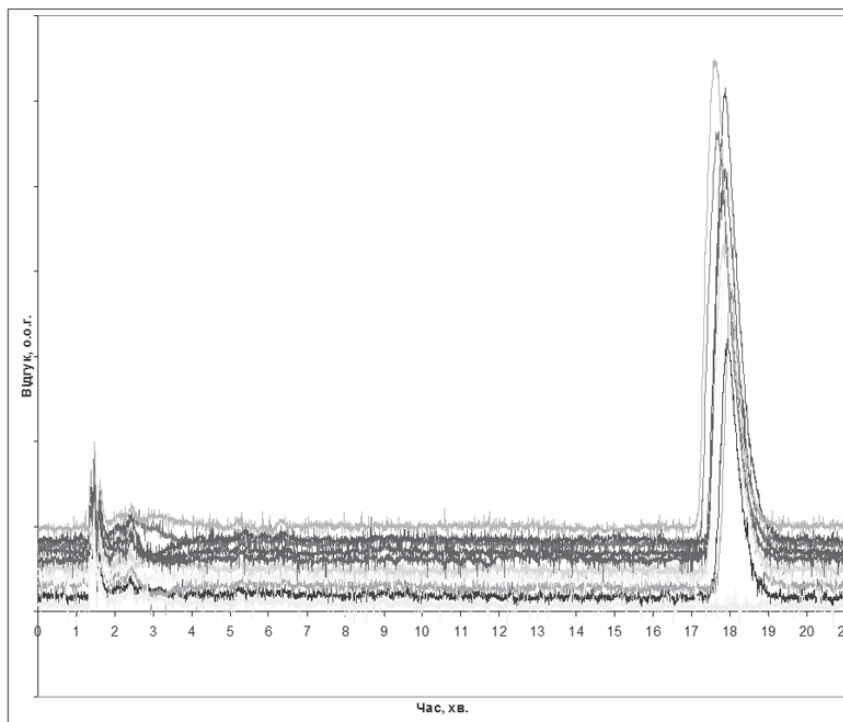


Рис. 1. Хроматограми розчину плацебо та модельних розчинів

На хроматограмі плацебо відсутній будь-який пік, що вказує на специфічність методики. В табл. 1 наведено визначення валідаційних критеріїв «правильність» та «збіжність».

Таблиця 1

№ модельного розчину	Концентрація модельного розчину, мг/мл	Концентрація в нормалізованих координатах, X_i , %	Середнє значення площ піків	Оптична густина в нормалізованих координатах, Y_i , %	$Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \times 100\%$
Стандартний розчин	1,001		1654,2180		
1	0,600	60,00	995,4580	60,18	100,29
2	0,700	70,00	1168,2540	70,62	100,89
3	0,800	80,00	1325,3950	80,12	100,15
4	0,901	90,00	1505,3690	91,00	101,11
5	1,001	100,00	1654,2180	100,00	100,00
6	1,101	110,00	1855,3190	112,16	101,96
7	1,201	120,00	2005,1280	121,21	101,01
8	1,301	130,00	2148,3850	129,87	99,90
9	1,401	140,00	2338,1240	141,34	100,96

Середнє $Z =$	100,70	
Стандартне відхилення $SD_Z =$	0,67	
Довірчий інтервал $\Delta\% = t(95\%; f) \times SD_Z =$	1,24	$< \max \Delta_{AS} = 3,2$
Перевірка незначущості систематичної похибки		
Систематична похибка $d[Z-100] =$	0,70	$< \max \delta = 1,024$
		$< \max \Delta_{AS} = 3,2$

Дані табл. 1 щодо критеріїв «правильність» та «збіжність» відповідають вимогам ДФУ.

Лінійність. На підставі оптичної густини модельних розчинів було побудовано калібрувальну пряму, як зображено на рис. 2.

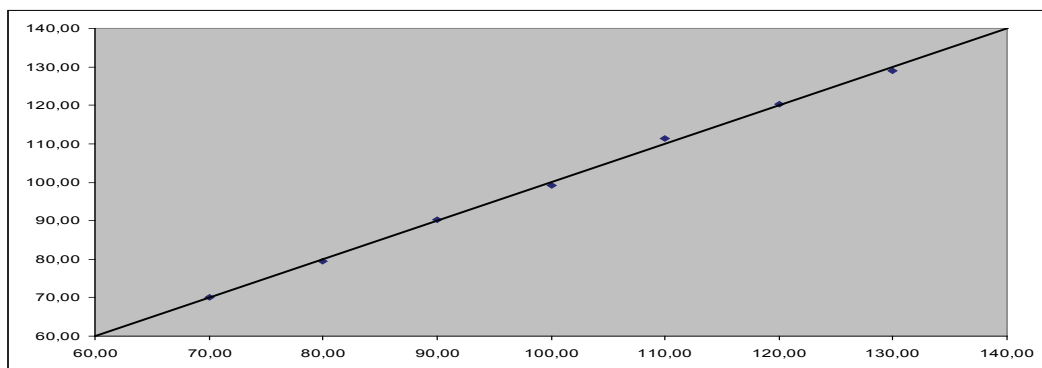


Рис. 2. Калібрувальна пряма залежності оптичної густини модельних розчинів від концентрації азитроміцину в них

В табл. 2 наведено визначення валідаційних критеріїв «лінійність».

Т а б л и ц я 2

Критичний параметр	Отриманий результат	Максимальне значення
Число ступенів свободи (f)	7	
Коефіцієнт Стьюдента ($t_{(0,95,f)}$)	2,36	
Кут нахилу ($b \pm S_b$)	$1,00 \pm 0,009$	
Вільний член ($a \pm S_a$)	$ -0,23 \pm 1,0157 $	$< 1,91$
Залишкове стандартне відхилення (RSD_0)	0,66	$< 1,70$
Коефіцієнт кореляції ($r_{(x)}$)	0,999663	$> 0,997802$
Ліміт визначення	3,34	
Ліміт кількісного визначення	10,13	

Дані, наведені в табл. 2, щодо критерію «лінійність», відповідають вимогам ДФУ.

Внутрішньолaborаторна точність. На підставі визначення азитроміцину в зразках у 3 різні дні різними хіміками встановлено відсутність впливу випадкових факторів при відтворюванні методики в лабораторії: критерій прийнятності $\Delta Z_{int.ra} = 2,89 < \max \Delta_{AS} = 3,20$.

Стабільність розчинів визначали протягом 4 год. У визначений термін встановлено стабільність забарвлення розчину та його придатність для проведення спектрофотометричного вимірювання: критерій прийнятності $0,9894 < \max \delta = 1,024$.

Порівняння методів. Проведено визначення вмісту азитроміцину в зразку лікарського засобу «АЗИТРОМІЦИН-АСТРАФАРМ», капсули по 250 мг серії 030908, методом ВЕРХ та порівняно результати з тими, що отримані при використанні СФ-методики на основі реакції з 2-нітробензальдегідом (табл. 3) наведено порівняння методів визначення азитроміцину.

Таблиця 3

Отримані результати	Методом СФ	Методом ВЕРХ
Визначення № 1	255	246
Визначення № 2	252	251
Визначення № 3	251	249
Визначення № 4	248	251
Визначення № 5	248	261
Кількість паралельних визначень (n)	5	5
Число ступенів свободи (f)	4	4
Середнє значення (\bar{X})	250,8	251,6
Дисперсія (S^2)	8,7	31,8
СКВ окремого визначення (S)	2,94	5,63
СКВ середнього визначення ($S_{\bar{X}}$)	1,31	2,52
Довірчий інтервал окремого визначення (ΔX)	8,19	15,67
Довірчий інтервал середнього визначення ($\Delta \bar{X}$)	3,66	7,01
Відносна похибка окремого визначення %, (E)	3,2	6,2
Відносна похибка середнього визначення %, ($E_{\bar{X}}$)	1,4	2,7
Задане значення величини (X)	250	250
t-критерій (t)	0,6064784	0,634441
Табличне значення F-критерію ($F(P;f_1;f_2)$)		6,39
Отримане значення t-критерію		3,66

Оскільки критерій прийнятності $3,66 < 6,39$, можна зробити висновок що отримані результати належать до однієї генеральної сукупності та різняться тільки в межах випадкової похибки.

Висновки

1. Впроваджено та валідовано методику кількісного визначення азитроміцину методом вискоєфективної рідинної хроматографії.

2. Проведено порівняння результатів аналізу серії лікарського засобу «АЗИТРОМІЦИН-АСТРАФАРМ», капсули по 250 мг, серії 030908, які отримані відповідно до впровадженої методики ВЕРХ та попередньо розробленої методом СФ за реакцією з 2-нітробензальдегідом за допомогою F-критерію.

3. Показано, що обидві методики дають змогу отримувати результати, що статистично не різняться.

1. USP30-NF25, P.1472.

2. Шкляев С.А., Цуркан О.О., Колядич О.П., Кулікова О.О. // Фармацевтичний журнал. – 2010. – № 6 – С. 50-55.

3. Валідація аналітичних методик і випробувань // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х.: РІРЕГ, 2001. – С. 58–67. – Доповнення 1. – 2004. – С. 2–4. – Доповнення 2. – 2008. – С. 85–100.

4. К. Дёрффель. Статистика в аналитической химии. – Пер. с нем. – М.: Мир, 1994.

5. Гризодуб А.И. // Фармаком. – 2002. – № 3 – С. 42–50.

6. Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Денисенко Н.В., Подпруджников Ю.В. // Фармаком. – 2004. – № 3 – С. 3–17.

Надійшла до редакції 29.12.2010.

С.А.Шкляев, А.А.Цуркан, Е.П.Колядич, О.А.Куликова

ВАЛИДАЦИЯ ВЭЖХ-МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЗИТРОМИЦИНА В
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМАХ И ЕЕ СРАВНЕНИЕ С СФ-МЕТОДИКОЙ ПО РЕАКЦИИ С
2-НИТРОБЕНЗАЛЬДЕГИДОМ

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, спектрофотометрия, 2-нитробензальдегид, азитромицин, валидация, F-критерий

Внедрена и валидирована методика определения азитромицина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Проведено сравнение результатов анализа серии капсулированного лекарственного средства, содержащего азитромицин, полученных в соответствии с внедренной методикой ВЭЖХ и предварительно разработанной СФ-методикой по реакции с 2-нитробензальдегидом с помощью F-критерия. Обе рассмотренные методики позволяют получать результаты, которые статистически не различаются.

S.A.Shklyayev, A.A.Tsurkan, E.P.Koliadich, O.A.Kulikova

HPLC PROCEDURE VALIDATION OF AZITHROMYCIN DETERMINATION IN MEDICINES
AND COMPARISON OF IT WITH SPECTROPHOTOMETRIC PROCEDURE BY REACTION
WITH 2-NITROBENZALDEHYDE.

Key words: high performance liquid chromatography, spectrophotometry, 2-nitrobenzaldehyde, azithromycin, validation, F-criteria

SUMMARY

It is introduced and validated a definition procedure of azithromycin by a high performance liquid chromatography. Comparison of results of the analysis of a series a medical product in form of capsules containing azithromycin, received according to introduced HPLC procedure and that preliminary developed by spectrophotometric on reaction with 2-nitrobenzaldegidom by means of F-criterion is spent. Both considered techniques allow to receive results which statistically do not differ.