

## Валідація методики визначення вмісту вуглеводнів у КДДШ

### П.8.1. Об'єкт дослідження

Типовим прикладом методик кількісного визначення сумарних препаратів є кількісне визначення суми вуглеводнів у субстанції *концентрат депротейнізованого дермального шару шкіри свиней* (КДДШ).

КДДШ — основна діюча речовина ліпосомного препарату «Ефіаль». Однією з кількісних характеристик якості КДДШ є вміст вуглеводнів (не менше 0.35 мг/мл). Визначення вмісту вуглеводнів проводиться спектрофотометрично за їх кольоровою реакцією з антроном (реакція Дрейвуда), у варіанті калібрувального графіка, що є достатньо характерним для біопрепаратів.

Відповідно до фармакопейних вимог, усі методики контролю якості лікарських засобів, які вводяться до специфікації, мають бути валідовані. Виникає питання валідації методики визначення вуглеводнів у КДДШ.

Усі використовувані реактиви і титровані розчини, мірний посуд і обладнання відповідали вимогам Фармакопеї. Попередньо проводили кваліфікацію спектрофотометра, як рекомендовано в П.4.1.

У субстанції *концентрат депротейнізованого дермального шару шкіри свиней* (КДДШ) вміст вуглеводнів у перерахунку на глюкозу регламентується специфікацією на рівні не нижче 0.35 мг/мл. За співвідношенням (11.1) знаходимо номінальний вміст вуглеводнів у КДДШ:

$$Cont_{nom} = 0.35 / 0.8 = 0.4375 \text{ mg / ml.} \quad (\text{П.8.1})$$

### П.8.2. Методика визначення вмісту вуглеводнів, що валідується

*Випробовуваний розчин:*  $V$  мл КДДШ переносять у мірну колбу місткістю  $V_b = 5$  мл і доводять водою  $P$  до мітки.

*Калібрувальні розчини:* 275.0 мг глюкози безводної (Fluka # 49152) переносять у мірну колбу місткістю 100 мл і доводять водою  $P$  до мітки (розчин А). Концентрація глюкози в розчині А дорівнює  $C_A = 2.75$  мг/мл. Враховуючи малу концентрацію ( $C_A$ ) глюкози в розчині А, його густину брали рівною густині води, тобто  $\rho_A = 1.000$  г/мл.

1.25, 1.75, 2.25 (узяті за номінальний), 2.75 і 3.25 мл розчину А помішають у зважені мірні колби місткістю  $V_{cal} = 100$  мл, зважують (отримують маси  $m_{sti}$ ) і доводять водою  $P$  до мітки (калібрувальні розчини).

По 1 мл випробовуваного розчину, калібрувальних розчинів і води  $P$  помішають у пробірки і переносять на 5 хв у льодовий охолоджувач. Потім у кожну пробірку додають 3 мл 0.1% розчину антрому (100 мг антрому Fluka #

10740 поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл і доводять до мітки за допомогою кислоти сірчаної  $P$ . Розчин використовують свіжоприготованим). Вміст пробірок добре перемішують і поміщають пробірки у водяний охолоджувач на 10 хв. Потім пробірки доводять до кімнатної температури і вимірюють оптичні густини  $A_i(cal)$  за довжини хвилі 620 нм. Як контрольний розчин використовують приготовлений, як описано вище, розчин на основі води  $P$ .

### П.8.3. Побудова калібрувальної прямої

Величини  $X_i(cal)$  розраховували за співвідношенням (11.6);  $C_i(cal)$  — за співвідношенням (11.7), тобто  $C_i(cal) = 2.75 \times m_i(cal) / (100 \times 1.000) = 0.0275 \times m_i(cal)$ ;  $Y_i(cal)$  — за співвідношенням (11.8).

Таблиця П.8.1

Результати аналізу калібрувальних розчинів

Об'єми розчину А, мл	Наважки розчину А, $m_i(cal)$ , г	$C_i(cal)$	$X_i(cal)$	$A_i(cal)$	$Y_i(cal)$
1.25	1.2272	0.03375	54.97	0.315	48.99
1.75	1.7217	0.04735	77.12	0.478	74.34
2.25	$2.2324 = m_i(cal)$	$0.06139 = C_{st}(cal)$	100.00	$0.643 = A_{st}(cal)$	100.00
2.75	2.7291	0.07505	122.25	0.772	120.06
3.25	3.2218	0.08860	144.32	0.925	143.86

Будували лінійну залежність (11.5)  $X_i(cal)$  від  $Y_i(cal)$ . Результати розрахунків методом найменших квадратів і одержані вище критерії наведені в Табл. П.8.2, а калібрувальний графік — на Рис. П.8.1.

Таблиця П.8.2

Метрологічні характеристики калібрувальної прямої (11.5)

$$X_i(cal) = b \times Y_i(cal) + a$$

Параметр	Значення	Метод калібрувального графіка (МКГ)		Метод стандарту (МС)	
		критерій	висновки	критерій	висновки
$a$	7.25	—	—	4.0	не відповідає
$s_a$	2.26	—	—		

$b$	0.949	—	—		
$s_b$	0.022	—	—		
$SD_{rest}$	1.64	< 1.9	відповідає	< 3.4	відповідає
$R_c^2$	0.99787	> 0.99764	відповідає	> 0.99512	відповідає

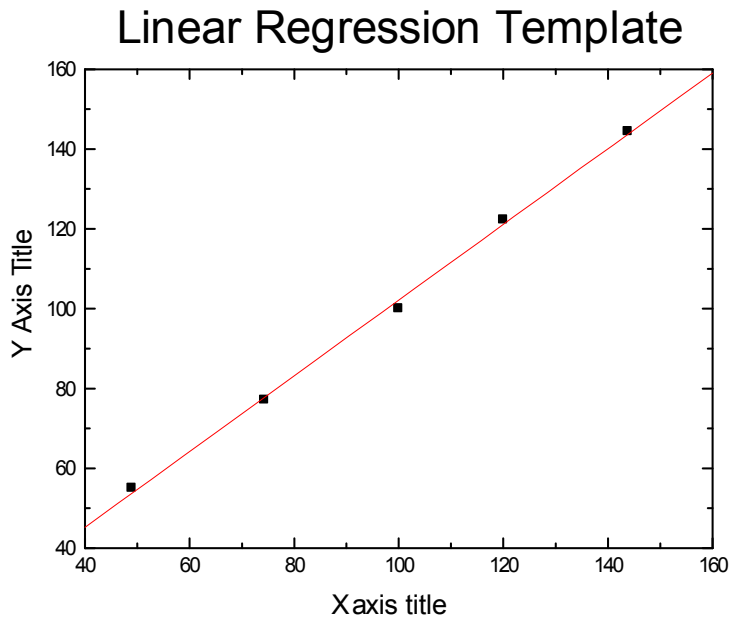


Рисунок П.8.1. Калібрувальний графік залежності концентрації глюкози безводної від оптичної густини в нормалізованих координатах

Як видно, лінійність виконується для МКГ, але не для МС — через практично значущий вільний член  $a$  лінійної залежності (11.5). Тобто в цьому випадку **МС не застосовний**.

#### П.8.4. Аналіз модельних сумішей препарату

##### П.8.4.1. Специфічність

Оптична густина необробленого препарату за довжини хвилі 620 нм дорівнює 0.043. Номінальне розбавлення препарату під час проведення реакції дорівнює 6.73 (див. нижче розчин Т5). Отже, оптична густина необробленого препарату за номінального розбавлення дорівнює  $A_\lambda = 0.043 / 6.74 = 0.0064$ . Оптична густина за довжини хвилі 620 нм розчину препарату Т5, обробленого за методикою, дорівнює  $A_o = 0.643$ . Тоді  $100 \times A_\lambda / A_o = 1.0 \leq 2.0 \%$ , тобто вимоги співвідношення (9.3) виконуються. Отже, специфічність витримується.

##### П.8.4.2. Приготування й аналіз модельних розчинів препарату

У попередніх дослідженнях було знайдено, що  $V_o = 0.75$  мл КДДШ (див. вище «Випробовуваний розчин») дає оптичну густину, яка приблизно дорівнює оптичній густині  $A_{st} = 0.6139$  із Табл. 11.1. Навколо цього середнього об'єму й отримували 9 розбавлень препарату (див. Табл. 11.3). У попередніх дослідженнях також була знайдена густина препарату  $\rho_s = 1.012$  г/мл, яку використовували для знаходження розбавлень за співвідношенням (11.10), яке в нашому випадку має вигляд  $Dil_i = 5.0 \times 1.012 / m_i = 5.060 / m_i$ .

Результати приготування й аналізу модельних сумішей препарату наведені в Табл. П.8.3. Величини  $Y_i$  розраховували за співвідношенням (11.11), використовуючи  $A_{st}(cal) = 0.643$  із Табл. 11.1, тобто  $Y_i = 100 \times A_i / 0.643$ . Величини  $X_i(out)$  знаходили за співвідношенням (11.5) з параметрами з Табл. 11.2, тобто  $X_i(out) = 0.949 \times Y_i + 7.25$ . Концентрацію вуглеводнів  $C_i(sample)$  в мг/мл у препараті КДДШ у перерахунку на глюкозу розраховували за співвідношенням (11.12), тобто  $C_i(sample) = X_i(out) \times 0.06139 \times Dil_i / 100 = X_i(out) \times 0.0006139 \times Dil_i$ . Водночас використовували  $C_{st}(cal) = 0.06139$  мг/мл із Табл. 11.1. Величину  $\Delta_{sample}$  розраховували за співвідношенням (11.16).

Таблиця П.8.3

## Результати аналізу модельних розчинів

№ розчину	Об'єм препарату, $V_i$ , мл	Маса, $m_i$ , г	Розбавлення, $Dil_i$	$A_i$	$Y_i$ , %	$X_i(out)$ , %	$C_i(sample)$ , мг/мл
T <sub>1</sub>	0.98	0.9912	5.1052	0.871	135.46	135.80	0.4256
T <sub>2</sub>	0.92	0.9299	5.4417	0.812	126.28	127.10	0.4246
T <sub>3</sub>	0.86	0.8697	5.8184	0.759	118.04	119.27	0.4260
T <sub>4</sub>	0.80	0.8046	6.2891	0.697	108.40	110.12	0.4252
T <sub>5</sub>	0.74	0.7514	6.7344	0.648	100.78	102.89	0.4254
T <sub>6</sub>	0.68	0.6912	7.3209	0.593	92.22	94.77	0.4259
T <sub>7</sub>	0.62	0.6264	8.0783	0.532	82.74	85.77	0.4254
T <sub>8</sub>	0.56	0.5703	8.8729	0.481	74.81	78.24	0.4262
T <sub>9</sub>	0.50	0.5043	10.034	0.42	65.32	69.24	0.4265
T <sub>1</sub>	0.98	0.9912	5.1052	0.871	135.46	135.80	0.4256
T <sub>2</sub>	0.92	0.9299	5.4417	0.812	126.28	127.10	0.4246
Середнє, $C_{sample}$							<b>0.4256</b>

$SD, \text{ мг/мл}$	0.0006
$RSD_{\text{sample}}, \%$	0.14
$\Delta_{\text{sample}} = 1.86 \times RSD_{\text{sample}}$	<b>0.26 &lt; 4.5 %</b>

Як видно, методика характеризується дуже доброю збіжністю, і вимоги (11.16) к  $\Delta_{\text{sample}}$  виконуються з дуже великим запасом. Це свідчить також про добру лінійність для зразку препарату в аналітичному діапазоні концентрацій суми вуглеводнів.

#### **П.8.4.3. Внутрішньолабораторна прецизійність**

Робили по три паралельних визначення препарату за методикою в два різних дні. Одержали  $C_{\text{sample}}(1) = 0.4256$ ,  $C_{\text{sample}}(2) = 0.4069$ ,  $\left| 200 \times (0.4069 - 0.4256) / (0.4056 + 0.4269) \right| = 4.5 < 5.2 \%$ . Як видно, виконується співвідношення (9.21), тобто виконується внутрішньолабораторна прецизійність.

Загальний висновок щодо валідації — **методика коректна.**